

Aus dem Pathologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. T. Kirchner

Thema der Dissertation:

Pharmakokinetik Humaner Mesenchymaler
Stammzellen in Mäusen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Jennifer Kuhlen

aus

Braunschweig

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. Ralf Huss

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Jochen Seißler

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiterin:

Dr. Ann-Marie Broeske

Dekan:

Prof. Dr. med. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung:

16.10.2015

Danksagung und Widmung:

Ich danke herzlich allen Personen, die mich bei dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben. Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Ralf Huss für die Möglichkeit, bei ihm das Thema „Pharmakokinetik Humaner Mesenchymaler Stammzellen in Mäusen“ bearbeiten zu dürfen, sowie für die kompetente Betreuung und die wertvollen Anregungen beim Abfassen der Arbeit. Herrn Prof. Dr. Thomas Kirchner danke ich für die freundliche Aufnahme als Doktorandin am Institut für Pathologie der LMU.

Besonders danken möchte ich auch Frau Dr. Ann-Marie Bröske, die mich während der Entstehung der Dissertation wissenschaftlich sehr kompetent betreut und mich jederzeit freundlich unterstützt hat.

Für die Durchführung der vorliegenden Arbeit und die ihr zu Grunde liegenden Laborexperimente und Tierversuche war ein intensiver Informations- und Erfahrungsaustausch hilfreich. Ich profitierte von anregenden Diskussionen mit Experten aus den unterschiedlichen Institutionen. Hierfür möchte ich an dieser Stelle insbesondere der TCI (Therapeutic Cell Initiative) der Firma Roche Diagnostics für ihre Hilfsbereitschaft, freundliche Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre danken, namentlich bei den Damen und Herren: Dr. Monika Bähner, Laura Diener, Dr. Julia Hupfeld, Dr. Saskia Knothe, Dr. Karin Künzter, Dr. Mathias Leddin, Dr. Annina Nisslbeck, Aline Pauschert, Katharina Scheidt, Dr. Carsten Stein, Christoffer von Schwerin, Kornelius Wiechmann sowie in besonderem Maße Herrn Dr. Markus Neubauer und Frau Dr. Heike Wegmeyer. Das Team der TCI hat mir geholfen, mich in das Thema einzuarbeiten, und hat mich bei den Laborarbeiten unterstützt. Für die Unterstützung auf weiteren Themengebieten danke ich folgenden Damen und Herren: Dr. Werner Scheuer und Franz Osl (Live Imaging), Dr. Jürgen Funk, Marielle Odin und Christelle Zundel (Pathologie und Histologie), Dr. Thomas Fischer und Yvonne März (Rare Cell Analyse) sowie Dr. Tobias Schnitzer und Helmut Niersbach (Antragstellung und Tierhaltung).

Herrn Prof. Dr. Ralf Huss danke ich insbesondere für die Betreuung, Berichterstattung und Unterstützung meines Dissertationsprojekts.

Ich danke meinen Eltern, dass sie mir mein Studium ermöglicht haben, und widme diese Arbeit meiner Familie Dr. Johannes, Eva und Dr. Beatrix Kühlen.

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Molekulare Interaktionen, die Migration und Engraftment von MSCs an den Ort der Entzündung begünstigen, modifiziert nach Poll et al. 2008.....	29
Tab. 2: Sarkomamodelle aus transformierten MSCs, nach Rodriguez et al. 2012a.....	32
Tab. 3: Literaturquellen zur Bioverteilung von mMSCs oder hMSCs in Mäusen.....	42
Tab. 4: MSC-basierte Zelltherapie in experimentellen Tiermodellen von DM, modifiziert nach Liu and Han 2008; Maged and Shahin 2012	54
Tab. 5: Elektronische Geräte	68
Tab. 6: Zellkultur Equipment	68
Tab. 7: Chemikalien, Reagenzien und Puffer.....	69
Tab. 8: Zelllinien	70
Tab. 9: Kits	70
Tab. 10: Antikörper für die RCA und die ICC	70
Tab. 11: Antikörper für die FACS Analyse.....	71
Tab. 12: Antikörper Isotypkontrollen und Sekundärantikörper.....	71
Tab. 13: Zubehör Ventana System.....	71
Tab. 14: Mausstämme.....	72
Tab. 15: Spezielle Materialien für die Haltung von Mäusen, für Tierversuche und Sektion ...	72
Tab. 16: Klimatische Bedingungen in der Tierhaltung Roche, Penzberg	73
Tab. 17: Software	73
Tab. 18: Standard Verdünnungsreihe PCR.....	83

Tab. 19: Cyclor Programm der Quantifiler RT-PCR.....	84
Tab. 20: Mauszellen pro Organ	85
Tab. 21: Schätzwerte der „Überlebensfunktion“ nach Kaplan-Meier für die Mäuse der Gruppen 1a und 1b	100
Tab. 22: Logrank-Test für die „Überlebensfunktion“ der Mäuse der Gruppen 1a und 1b.....	101

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MSC Biologie im Bild, modifiziert nach Neubauer et al. 2012; Lindner et al. 2010	23
Abbildung 2: Das Yin und Yang von MSCs: Zusammenfassung der Abweichungen verschiedener Konzepte und translationaler Ansätze, modifiziert nach Bianco et al. 2013	25
Abbildung 3: MSC Interaktionen mit Immunzellen, modifiziert nach Williams and Hare 2011	26
Abbildung 4: Trophische Mechanismen der MSC Therapie: Modifiziert nach Lin et al. 2011; Poll et al. 2008.....	29
Abbildung 5: Anti-inflammatorische Effekte von MSCs in Gewebereparatur. Modifiziert nach Hong et al. 2012	31
Abbildung 6: Theoretisch mögliche Mechanismen des indirekten Eingreifens von MSCs in Tumorwachstum während einer MSC-Therapie, modifiziert nach Wong 2011.....	34
Abbildung 7: Hypothese des intravaskulären Schicksals kulturexpandierter MSCs. Modifiziert nach Toma et al. 2009	40
Abbildung 8: Therapeutische Aktivität in der MSC-Therapie. Modifiziert nach Parekkadan and Milwid 2010	41
Abbildung 9: Betazellmasse in den verschiedenen DM Typen, modifiziert nach Madsen 2005; Madsen and Kaestner 2004	51
Abbildung 10: Emissions-Wellenlängen von DiO, Dil, DiD und DiR, modifiziert nach Invitrogen	64
Abbildung 11: Vergleich aktueller Methoden zum (Stamm-) Zelltracking <i>ex vivo</i> und <i>in vivo</i> , modifiziert nach Li et al. 2010	66

Abbildung 12: SP-DIO ist in einer dreitägigen Cokultur von gefärbten Mauszellen und ungefärbten humanen MSCs im Verhältnis 1:10 übertragbar.	87
Abbildung 13: In der Cokultur von SP-DIO gefärbten hMSCs mit ungefärbten murinen p53/-MSCs ist im FACS Experiment eine Übertragung von SP-DIO zwischen den Zelltypen sichtbar.	88
Abbildung 14: SP-DIO Fluoreszenz bleibt in sich teilenden hMSCs <i>in vitro</i> mindestens 9 Tage und in nicht teilenden hMSCs mindestens 49 Tage detektierbar.....	90
Abbildung 15: Die DIO Färbung verändert nicht die Oberflächenmarker Expression der positiven ISCT Marker auf hUC MSC.....	91
Abbildung 16: DIO verändert nicht die Oberflächenmarker-Expression der negativen ISCT Marker auf hUC MSC	92
Abbildung 17: die DIO-Färbung verändert nicht die immunmodulatorischen Eigenschaften der hMSC	93
Abbildung 18: Die <i>in vitro</i> Differenzierung von SP-DIO gefärbten hUC MSCs und ungefärbten hUC MSCs zeigt in den drei mesenchymalen Linien Fett, Knochen und Knorpel keine Unterschiede	94
Abbildung 19: Blutglukose Messwerte für die Mäuse der Gruppe 1a.....	95
Abbildung 20: Blutglukose Messwerte für die Mäuse der Gruppe 1b.....	96
Abbildung 21: Blutglukose Messwerte für die Mäuse der Gruppe 2a.....	97
Abbildung 22: Blutglukose Messwerte für die Mäuse der Gruppe 2b.....	98
Abbildung 23: Schätzung der „Überlebensfunktion“ (nicht-Diabetes-Inzidenz) für die Mäuse der Gruppen 1a und 1b	100
Abbildung 24: Pharmakokinetik der hMSCs pro 250.000 Maus Organ Zellen.....	103
Abbildung 25: Pharmakokinetik der hMSCs pro 250.000 Maus Lungen Zellen.....	104

Abbildung 26: Verteilung der hMSCs in ganzen Organen von Wildtyp und Diabetes Mäusen, angeben in % der ursprünglich injizierten Zellezahl (Median der Gruppe).....	105
Abbildung 27: SP-DIO gefärbte hUC MSCs zeigen in der ICC die positiven ISCT Marker CD73 und CD90.....	106
Abbildung 28: SP-DIO gefärbte hUC MSCs zeigen auch mit Mausblut vermischt und nach Prozessierung der RCA in der ICC die positiven ISCT Marker CD73 und CD90.	107
Abbildung 29: Immunstimulierte SP-DIO gefärbte hUC MSCs zeigen in der ICC die positiven ISCT Marker CD73 und CD90.....	107
Abbildung 30: Immunstimulierte, SP-DIO gefärbte hUC MSCs zeigen auch mit Mausblut vermischt und nach Prozessierung der RCA in der ICC die positiven ISCT Marker CD73 und CD90.	108
Abbildung 31: Histologische und Immunhistochemische Aufnahmen von Lungen und Pankreata diabetischer und Wildtyp Mäuse 30 Minuten nach einer hMSC Transplantation	109
Abbildung 32: Embolien, Lymphozytenaggregate in Langerhans Inseln und Lymphozyten in Mäusen	110
Abbildung 33: Blutglukoseentwicklung von NOD Mäusen nach Injektion von hMSC oder PBS.....	111
Abbildung 34: NIRF-Experiment: Der Maus wurden $1 \bullet 10^6$ DID-gefärbte hMSCs in die Schwanzvene injiziert und anschließend mit NIRF Licht holographiert.	111
Abbildung 35: Optimaler Zeitpunkt für die MSC Therapie, Quelle: modifiziert nach Couri et al. 2012.....	116
Abbildung 36: Vorgeschlagenes Pharmakokinetisches Drei-Kompartiment-Modell von i.v. injizierten hMSCs.....	118

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
¹⁸ F	¹⁸ F-fluoro-2-deoxyglukose
⁶⁴ Cu	Kupfer-64
a. dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
ADME	Absorption, Distribution, Metabolisierung, Exkretion
ALDH	Aldehyd Dehydrogenase
AM	Amnionmembran,
APC	Allophycocyanin
ATMPs	Advanced Therapy Medicinal Products
BALB/c	= Balb/c
Balb/c	BALB/cAnNTac (Maustyp)
BD	Becton Dickinson
BLI	Biolumineszenz
C57Bl/6 Maus	C57 black 6"- laboratory mouse
CCD	charge-coupled device
CCR2	Chemokin Rezeptor 2, auch CD192
CCR3	Chemokin Rezeptor 3, auch CD193
CCR4	Chemokin Rezeptor 4, auch CD194
CD105	Cluster of Differentiation 105, auch Endoglin
CD106	Cluster of Differentiation 106, auch VCAM-1
CD11b	Cluster of Differentiation 11b, auch Integrin alpha M
CD14	Cluster of Differentiation 14
CD184	Cluster of Differentiation 184, siehe CXCR4
CD19	Cluster of Differentiation 19
CD273	Cluster of Differentiation 273, auch PDCD1LG2
CD274	Cluster of Differentiation 274, auch PDCD1LG1
CD34	Cluster of Differentiation 34
CD4	Cluster of Differentiation 4
CD40	Cluster of Differentiation 40
CD44	Cluster of Differentiation 44, siehe HCAM
CD45	Cluster of Differentiation 45, siehe PTBRC
CD49d	Cluster of Differentiation 49d, auch VLA-4 Rezeptor
CD54	Cluster of Differentiation 54, auch ICAM-1
CD73	Cluster of Differentiation 73, auch 5'-Nucleotidase
CD79α	Cluster of Differentiation 79α, auch B-cell Antigen Rezeptor Komplex- assoziiertes Protein Alpha Kette
CD8+	Cluster of Differentiation 8
CD80	Cluster of Differentiation 80, auch B7-1

CD86	Cluster of Differentiation 86, auch B7-2
CD90	Cluster of Differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CHOP	C/EBP Homologous Protein; also termed DDIT3, DNA Damage-Inducible Transcript 3
CLS I	Kollagenase Typ I
c-met	Proteinname, auch HGFR
c-Myc	Proteinname (von Myelocytomatose)
CO ₂	Carbon dioxide, Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
CX3CL1	C-X3-C Motif Ligand 1
CX3CR1	CX3C Chemokine receptor 1, auch GPR13
CXCL8	CXC-Motiv-Chemokin 8, auch IL-8
CXCR4	C-X-C Chemokine Receptor Typ 4, auch Fusin oder CD184
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DiD	= DiIC18(5) (1,1'-Di-octadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindodicarbocyanin, 4-Chlorobenzenesulfonat Salz)
Dil	DiIC18(3) (1,1'-Di-octadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindodicarbocyanin Perchlorat
DiO	3,3-Di-octadecyloxacarbocyanine perchlorate, Molecular Formula: C ₅₃ H ₈₅ ClN ₂ O ₆
DiR	DiIC18(7) (1,1'-Di-octadecyltetramethyl indotricarbocyanin Jodid
dl	deziliter
D-Luciferin	Firefly Luciferin, (S)-2-(6-Hydroxy-2-benzothiazolyl)-2-thiazoline-4-carboxylic acid, 4,5-Dihydro-2-(6-hydroxy-2-benzothiazolyl)-4-thiazolecarboxylic acid
DM	Diabetes mellitus
DMF	Dimethyl Formamide
DMT1	siehe: T1D
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DT	Doubling Time, Verdoppelungszeit
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
eGFP	Enhanced green Fluorescence
ESCs	Embryonale Stammzellen
et al	Et alii, und andere
EWS-FLI-1	Ewing's Sarcoma - Friend leukemia integration 1 transcription factor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting, Durchflusszytometrie
FCS	Fetal Calf Serum, Fötales Kälber Serum
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
FGF	Fibroblast Growth Factor
FISH	Fluorescent In Situ Hybridization

FUS	Fused in Sarcoma
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Gd3+	Gadolinium(III)+
GFP	Grünes Fluoreszenz Protein, Green Fluorescent Protein
GPR13	G-protein coupled receptor 13
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
h	Stunde
HCAM	homing cell adhesion molecule, siehe CD44
HE	Hämatoxylin und Eosin
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen-DR
hMSCs	Humane Mesenchymale Stammzellen
HO-1	Häm Oxygenase 1
Hoechst33342	bisBenzimid
HSV1-tk	Herpes Simplex Virus Typ 1 Thymidin Kinase
hTERT	human telomerase reverse transcriptase gene
hUC MSC	Human Umbilical Cord-derived Multipotent Mesenchymal Stem Cells
HWZ	Halbwertszeit
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
ICC	Immuncytochemie
IDO	Indoleamin 2,3,-Dioxygenase
IFN- γ	Interferon- γ
IGF-1	Insulin-Like Growth Factor-1
IgG1, κ	Immunglobulin G1, κ
IgG2a, κ	Immunglobulin G2, κ
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
iPS	Induzierte Pluripotente Stammzellen
ISCT	International Society of Cell Therapy
K1	Extravasation (Kompartiment 1)
K2	Intravasation (Kompartiment 2)
kDa	KiloDalton (atomare Masseneinheit)
Klf4	Kruppel-like factor 4
KM	Knochenmark

LADA	Latent Autoimmune Diabetes in Adults
Lin28	ein Entwicklungsgen, das in den Zellen der meisten vielzelligen Tiere vorkommt
LRP	Liver-Regulating Protein
LSAB Methode	Labelled Streptavidin-Biotin Methode
M	molar
MACS	Magnetic-Activated-Cell-Sorting
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MEFs	Mouse Embryonic Feeder Cells
mg	milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMP	Matrix Metalloproteinase
mMSCs	murine Mesenchymale Stammzellen
MODY	Maturity-Onset-Diabetes of the Young
MPIOs	Mikro-große Eisenoxid Partikel, Micro-sized Iron-Oxide Particles
MRT	Magnetresonanztomographie
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
Nanog	ein Homöoboxprotein
NIRF	Near-Infrared-Fluorescence
NK Zellen	Natural Killer Zellen
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	nonobese diabetic
Oct3/4	Octamer binding transcription factor 3/4
p53	p53-Protein (ein Tumorsuppressor)
PAX-FKHR	fusion genes resulting from the t(2;13) or t(1;13) chromosomal translocations
PBMCs	humane periphere Blut mononukleäre Zellen
PCR	Polymerase-Chain-Reaction
PD	Populationsverdoppelung
PDCD1LG1	Programmed cell death 1 ligand 1, auch CD274
PDCD1LG2	Programmed cell death 1 ligand 2, auch CD273
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
PET	Positronen Emissions Tomographie
pg	Picogramm (=ein billionstel Gramm)
PGE2	Prostaglandin E2
pH-Wert	der negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PK	Pharmakokinetik
PKH26	Fluorophor [strukturell identisch mit DiIC18(3)]
PLGA	Polylactid-co-Glycolid
PTBRC	Protein Tyrosin Phosphatase Rezeptor Typ C

QDs	Quantum Dots
Rb	Retinoblastom
Rc	Rate of Clearance
RCA	Rare Cell Analysis
RCS	Rare Cell System (siehe: RCA)
RFP	Rotes Fluoreszenz Protein, Red Fluorescent Protein
RT-PCR	Real-Time Polymerase Kettenreaktion (Real-Time Polymerase Kettenreaktion)
s.c.	subcutan
SCF	Stem Cell Factor
SCID	Severe Combined Immunodeficient
SCT	Stem Cell Transplantation
SDF-1	Stromal Cell-Derived Factor-1
Sox2	sex determining region Y (SRY)- box 2“ / „geschlechtsbestimmende Region Y-Box 2“, [= ein Transkriptionsfaktor, der essentiell für die Aufrechterhaltung der Selbsterneuerung von undifferenzierten embryonalen Stammzellen ist]
SP-DIO	SP-3,3-Dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate, Molecular Formula: C53H85ClN2O6
SP-DIOC18(3)	3,3'-dioctadecyl-5,5'-di(4-sulfophenyl)oxacarbocyanine, sodium salt Molekularformel: C65H91N2NaO8S2, (a DiO analog that contains sulfonate groups to improve water solubility)
SPECT	Single Photon Emissions Computer Tomographie
SPIO	Superparamagnetisches Eisenoxid
STZ	Streptozotozin
STZ-C57/Bl6 Mäuse	Streptozotocin-"C57 black 6"- laboratory mouse,
T1	longitudinale Relaxation
T1D	Typ 1 Diabetes mellitus
T2	transverse Relaxation
T2D	Typ 2 Diabetes mellitus
TdT	terminal desoxynucleotidyl transferase (Enzym)
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
Th1-Zellen	T-Lymphozyten vom Helfertyp 1
TLS/FUS-CHOP	Translocated in Sarcoma/ Fused in Sarcoma - CHOP
TMDD	Target-Mediated Drug Disposition
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α
Trypsin-EDTA	Trypsin/Ethylendiamintetraacetat
TSG-6	Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein
TUNEL	TdT-mediated dUTP-Biotin Nick End Labeling
T-Zelle	Thymus Zelle
u. a.	unter anderem

u. s. w.	und so weiter
U/ml	units per milliliter
UC	Nabelschnur, Umbilical Cord
UCB	Nabelschnurblut, Umbilical Cord Blood
UC-MSCs	Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells , Nabelschnur MSCs
USPIO	ultra kleines Superparamagnetisches Eisenoxid, Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGF-C	Vascular endothelial growth factor C
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
µl	Mikroliter

1. Einleitung	18
1.1 Stammzellen	18
1.1.1.1 Embryonale Stammzellen	19
1.1.1.2 Induzierte pluripotente Stammzellen	19
1.1.1.3 Adulte Stammzellen.....	21
1.1.1.4 Mesenchymale Stammzellen	21
1.2 Pharmakokinetik.....	36
1.2.1.1 Allgemein	36
1.2.1.2 Target-mediated drug disposition	36
1.2.1.3 Pharmakokinetik von Mesenchymalen Stammzellen	36
1.3 Diabetes mellitus	46
1.3.1.1 Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2.....	48
1.3.1.2 Diabetes mellitus Mischformen	50
1.3.1.3 DM im Tiermodell.....	51
1.3.1.4 T1D Mausmodell: Nonobese Diabetic (NOD) Maus	51
1.3.1.5 T2D Mausmodelle	52
1.3.1.6 DM Therapien.....	53
1.3.1.7 DM und MSC	53
1.4 Tracking von Zellen	56
1.4.1.1 Bildgebende Verfahren.....	57
1.4.1.2 Magnetresonanztomographie.....	59
1.4.1.3 PET und SPECT	60
1.4.1.4 Optisches Imaging	61
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit.....	67
2. Material und Methoden	68
2.1 Material.....	68
2.1.1.1 Zellkultur Equipment.....	68
2.1.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Puffer	69
2.1.1.3 Zelllinien.....	70
2.1.1.4 Kits.....	70
2.1.1.5 Antikörper.....	70
2.1.1.6 Zubehör für das Ventana Histologie System IHC	71
2.1.1.7 Mausstämme	72
2.1.1.8 Materialien für Maushaltung, Tierversuche und Sektion	72
2.1.1.9 Maushaltung	73
2.1.1.10 Software	73

2.2 Methoden.....	74
2.2.1.1 Zellexpansion: Expansion von MSCs aus UC und KM	74
2.2.1.2 Histologische Färbungen	74
2.2.1.3 Immunhistochemie	74
2.2.1.4 Zellzählung	75
2.2.1.5 Zellen einfrieren und auftauen.....	75
2.2.1.6 Isolierung von MSCs aus menschlicher Nabelschnur	76
2.2.1.7 Zellkultivierung und –expansion	76
2.2.1.8 Immunosuppressive Eigenschaften von MSCs <i>in vitro</i>	77
2.2.1.9 MSC Membranfärbung mit SP-DIO und DID.....	78
2.2.1.10 Fluorescence-activated-cell-sorting Analyse	78
2.2.1.11 <i>In vitro</i> Differenzierung der MSCs	79
2.2.1.12 Beschreibung der verwendeten Mauslinien	79
2.2.1.15 Blutzuckerbestimmung	80
2.2.1.16 Diabetes Ausbruch (Onset) bei NOD Mäusen	80
2.2.1.17 Diabetes Ausbruch (Onset) bei Balb/c Mäusen	81
2.2.1.18 MSC Transplantation	82
2.2.1.19 Organentnahme	82
2.2.1.20 DNA Gewinnung aus Mausgeweben	82
2.2.1.21 Methoden zur Pharmakokinetik	83
3. Ergebnisse.....	87
3.1 Charakterisierung der MSC Biologie: fluoreszenzmarkierte und unmarkierte MSCs.	87
3.1.1.1 <i>In vitro</i> Übertragbarkeit des SP-DIO Labels von hMSCs auf Mauszellen.....	87
3.1.1.2 Haltbarkeit der SP-DIO-Markierung in hMSCs	89
3.1.1.3 ISCT Kriterien FACS Panel	90
3.1.1.4 Einfluss von SP-DIO auf die <i>in vitro</i> immunmodulatorischen Eigenschaften von MSCs	92
3.1.1.5 <i>In vitro</i> Differenzierung von MSCs.....	93
3.2 Diabetes Ausbruch (Onset).....	94
3.2.1.1 NOD-Mäuse (Gruppe 1a)	95
3.2.1.2 NOD-Mäuse mit Cyclophosphamid (Gruppe 1b).....	96
3.2.1.3 Balb/c - Mäuse (Gruppe 2a)	97
3.2.1.4 Balb/c – Mäuse (Gruppe 2b).....	97
3.2.1.5 Vergleich der Gruppen 1a („NOD Mäuse unbehandelt“) und 1b („NOD Mäuse mit Cyclophosphamid-Injektion“)	99
3.2.1.6 Zum Vergleich der Gruppen 2a („Balb/c Mäuse mit 5 Injektionen Streptozotozin“) und 2b („Balb/c Mäuse mit 1 Injektion Streptozotozin + Fettdiät“)	101
3.3 Pharmakokinetik von hMSCs in Wildtypmäusen und diabetischen Mäusen.....	102

3.3.1.1 Pharmakokinetik von hMSCs in Mäusen, PCR-Daten.....	103
3.3.1.2 Pharmakokinetik von hMSCs in Mäusen	106
3.3.1.4 Histologie Ergebnisse	108
3.3.1.5 Ergebnisse der Blutglukosebestimmungen.....	110
3.3.1.6 NIRF Ergebnisse.....	111
3.4 Zusammenfassung Ergebnisse.....	112
4. Diskussion.....	113
4.1 Zur Wahl der Methoden für die Analyse der PK in Mäusen.....	113
4.2 Diabetesstatus diabetischer NOD Mäuse unter hMSC-Therapie	115
4.3 Sicherheit und Bioverteilung von i.v. applizierten hMSCs in Mäusen	116
4.4 Vergleich der Pharmakokinetik in Wildtyp und Diabetes Typ 1 Mäusen.....	117
4.5 Anwendungen und Perspektive	119
5. Zusammenfassung / Summary	120
5.1 Zusammenfassung	120
5.2 Summary.....	121
6. Literatur	123

1. Einleitung

1.1 Stammzellen

Die Idee einer Stammzelle als Vorläuferzelle eines Gewebes wurde bereits von Ernst Haeckel im 19. Jahrhundert veröffentlicht. Davon beeinflusst entwickelte Theodor Boveri um 1900 sein Konzept über Stammzellen, in dem er postulierte, eine Stammzelle habe die Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie zur Differenzierung¹. Beide Fähigkeiten werden auch heute noch zur Definition von Stammzellen verwendet: Stammzellen haben die Kapazität zur kontinuierlichen und dauerhaften Selbsterneuerung unter kontrollierten Bedingungen und sie behalten das Potential, durch Initiierung eines Differenzierungspfad, der in der Produktion reifer Vorgängerzellen endet, in eine Vielfalt von spezialisierten Zellen zu differenzieren.² Stammzellen lassen sich in den meisten Geweben finden.³ Durch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung erhalten sie das Stammzellreservoir eines Gewebes, tragen zu Reparatur und Ersatz von Zellen bei, die durch Gewebeschaden zerstört wurden, und ersetzen Zellen, die aufgrund der regulären Alterung ausfallen. Sie sind also für die zelluläre Regeneration und Homöostase zuständig.⁴

Stammzellen werden anhand ihres Entwicklungspotentials als totipotent, pluripotent und multipotent klassifiziert. Eine totipotente Zelle hat die Fähigkeit, sofern maternale Unterstützung besteht, einen ganzen Organismus zu bilden. Das bedeutet, dass die Zygote und ihre direkten Nachkommen im Blastulastadium totipotent sind, da jede individuelle Zelle den Ursprung für embryonales und extraembryonales Gewebe bilden kann, der für die Säugetierentwicklung benötigt wird. Nach Verdichtung und Blastozystenformation sind die Zellen der inneren Zellmasse pluripotent, denn sie können sich in alle Keimblätter des Embryos entwickeln. Adulte Stammzellen, die auch als Gewebe-spezifische Stammzellen bezeichnet werden, sind in den Phasen nach der Embryonalentwicklung präsent. Sie werden als multipotent bezeichnet, da sie sich nur noch in Zellen differenzieren können, die ihrem Gewebe-Ursprung entsprechen.⁵

1 Maehle 2011

2 Ryan et al. 2005; Serafini and Verfaillie 2006

3 Ren et al. 2012

4 Couri et al. 2012; Ren et al. 2012

5 Serafini and Verfaillie 2006

1.1.1.1 Embryonale Stammzellen

Das befruchtete Ei ist der Startpunkt des Embryos. Die Entdeckung, dass die innere Zellmasse der Blastozyste Embryonale Stammzellen (ESCs) beinhaltet, die die Fähigkeit haben, einen kompletten Fötus zu produzieren, hat Forscher dazu veranlasst, die Mechanismen zu untersuchen, die in zelluläre Differenzierung und Gewebe-Entwicklung involviert sind.⁶ Diese ESCs, die ca. 4 bis 5 Tage nach Fertilisierung aus der Blastocyste gewonnen werden können, sind pluripotente Zellen, da sie fähig sind, in alle Gewebe der drei embryonalen Keimblätter Endoderm, Mesoderm und Ektoderm zu differenzieren.⁷ Zuerst beschrieben wurden ESCs aus der Blastozyste der Maus im Jahr 1981⁸ und einige Jahre später auch aus der Blastozyste menschlicher Embryonen⁹. Obwohl ESCs widerstandsfähig, einfach zu expandieren und im Labor einfach manipulierbar sind¹⁰, begrenzen einige Aspekte ihre Benutzung zu therapeutischen Zwecken. So gibt es religiöse Vorbehalte und ethische Bedenken.¹¹ Zudem treten Gefährdungen für Patienten auf, da ESCs durch den Verbleib einiger undifferenzierter pluripotenter Zellen im Transplantat das Potential besitzen, nach der Transplantation Tumore zu bilden.¹² Diese Bedenken gegenüber dem klinischen Einsatz von ESCs führten zu Bestrebungen, ethisch akzeptierbare und in der Anwendung sichere Alternativen zu finden.¹³

1.1.1.2 Induzierte pluripotente Stammzellen

Eine der ethisch akzeptierbaren Alternativen zu den ESCs stellen die induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSCs) dar. 2006 gelang es der Gruppe vom Yamanaka, mit Hilfe der retroviralen Einschleusung von den vier in ESCs hoch exprimierten Genen Oct-3/4, Sox2, KLF4 und c-Myc, Mausfibroblasten in einen ESC-ähnlichen, pluripotenten Zustand zurück zu programmieren. Pluripotenz, Morphologie und Proliferation sind bei iPSCs ähnlich wie bei ESCs.¹⁴ 2007 zeigte dieselbe Gruppe und zeitgleich auch die Gruppe von James Thompson, dass die Rückprogrammierung humaner somatischer Zellen zu iPSCs ebenfalls möglich ist. Yamanakas Gruppe programmierte humane Fibroblasten durch die gleichen Gene Oct3/4, Sox2, Klf4, und c-Myc zurück, die auch schon im Mausembryo eine Rückprogrammierung

6 Calne et al. 2010; Schroeder 2012

7 Nagano et al. 2008; Godfrey et al. 2012

8 Evans and Kaufman 1981

9 Thomson et al. 1998

10 Couri et al. 2012

11 Couri et al. 2012

12 Ensenat-Waser et al. 2006; Ensenat-Waser et al. 2009; Fujikawa et al. 2005; Xu et al. 2004

13 Gonez and Knight 2010

14 Takahashi and Yamanaka 2006

ermöglicht hatten,¹⁵ während Thompsons Gruppe mit Hilfe der Gene Oct4, Sox2, Nanog und Lin28 eine Rückprogrammierung humaner somatischer Zellen ermöglichte. Auch die humanen iPSCs zeigen eine Aktivität der Telomerase, exprimieren ESC-spezifische Marker und haben das Potential, in spezialisierte Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren.¹⁶

Durch die Erkenntnis, dass sich terminal differenzierte, somatische Zellen wieder in einen pluripotenten, ESC-ähnlichen Zustand zurück programmieren lassen, wuchs die Hoffnung, autologe iPSCs ohne das Risiko einer Abstoßung und ohne ethische Restriktionen als Organersatz patientenspezifisch generieren zu können.¹⁷ Dieser Idee stehen zurzeit noch einige Sicherheitsaspekte entgegen, insbesondere genetische und epigenetische Unregelmäßigkeiten, Tumorigenität und die Immunogenität transplanteder Zellen.¹⁸ Um die Gefahr, die von der retroviralen Einschleusung der Pluripotenz-Gene ausgeht,¹⁹ zu umgehen, sind alternative Transfektionsmethoden eingesetzt worden. Zu diesen Transfektionsmethoden gehören liposomale Magnetofektion²⁰, humane künstliche Chromosomen²¹, transiente Expression durch Reprogrammierungsfaktoren wie Adenoviren²² oder Plasmide²³ sowie das direkte Liefern der Reprogrammierungsproteine. Diese transienten Expressionsmethoden können genetische Veränderungen in iPSCs verhindern, sind aber bisher zu ineffizient.²⁴ Aus Sicherheitsgründen sollten die Feederzellen, auf denen ESCs und iPSCs wachsen und die häufig murinen Ursprungs sind (mouse embryonic feeder cells, MEFs), xenogenfrei sein, wenn iPSCs in der humanen Therapie eingesetzt werden sollten. Es wurde gezeigt, dass auch autologe Patienten-Fibroblasten als Feederzellen benutzt werden können.²⁵ Mit der Wahl einer sicheren und genügend effizienten Transfektionsmethode und der xenogen-freien Kultivierung von iPSCs sind einige Vorbehalte in der iPSC Therapie ausgeräumt, allerdings bleibt die Gefahr der Tumorigenität der iPSCs, sollten sich Reste pluripotenter Zellen in

15 Takahashi et al. 2007

16 Yu et al. 2007

17 Seufert 2011

18 Okano et al. 2013

19 Die meisten humanen iPSCs werden durch virale Vektoren hergestellt, wie Retroviren und Lentiviren, die sich in das Wirtsgenom integrieren. Durch diese zufällige Integration kann sich das Tumorrisiko der Wirtszelle erhöhen (Okita and Yamanaka 2011).

20 Park et al. 2012

21 Hiratsuka et al. 2011

22 Okita and Yamanaka 2011

23 Okita et al. 2010; Okita et al. 2011

24 Okita and Yamanaka 2011

25 Takahashi et al. 2009

einem Transplantat befinden. Ob dieses Problem behoben werden kann, ist vorläufig nicht abzusehen.²⁶

1.1.1.3 Adulte Stammzellen

Eine weitere Alternative zu ESCs sind adulte Stammzellen, auch Gewebestammzellen genannt, die sich aus verschiedenen Geweben von Säugetieren isolieren lassen, ohne dass dabei ein Embryo zerstört werden muss. Sie sind höher differenziert als ESCs, jedoch nicht terminal differenziert, und für den Erhalt eines Gewebes zuständig.²⁷ Die adulten Stammzellen wurden zuerst in Organen mit einer hohen Teilungsrate entdeckt wie Blut, Haut, Darm und Hoden.²⁸ Sie konnten auch aus perinatalen Quellen wie Amnionmembran, Chorion, Nabelschnur, Nabelschnurblut und Whartonscher Sulze sowie aus Geweben vollständig entwickelter Organismen von Feten bis hin zu Erwachsenen gewonnen werden.²⁹ Es wird angenommen, dass adulte Stammzellen in allen Geweben vorkommen, deren Teilungsrate höher ist als die von zentralem Nervensystem und Myokard.³⁰ Trotz geringer Toleranz gegenüber *in vitro* Manipulation, eines geringen Proliferationspotentials und eingeschränkter Plastizität wurden diese Zellen ausführlich in der regenerativen Medizin untersucht, da sie den ESCs und iPSCs in Fragen der ethischen Bedenken bzw. Tumorigenität in der Stammzelltherapie überlegen sein dürften.³¹

1.1.1.4 Mesenchymale Stammzellen

1.1.1.4.1 Allgemein

Eine Untergruppe adulter Stammzellen bilden die Mesenchymalen Stammzellen (MSCs), die in der regenerativen Medizin häufig eingesetzt werden aufgrund guter *in vivo* Proliferationsraten, einem hohen Differenzierungspotential und ihrer immunmodulatorischen Effekte.³² MSCs wurden zuerst aus dem Knochenmark isoliert und vor über 30 Jahren von Friedenstein³³ erstmals beschrieben als Hämatopoese-unterstützende Stromazellen des Knochenmarks mit osteogenem Differenzierungspotential. Friedenstein und seine Kollegen plattierten eine Zellsuspension aus dem Beckenkamm auf Plasikschalen aus. Sie beobachteten

²⁶ Seufert 2011

²⁷ Godfrey et al. 2012

²⁸ Serafini and Verfaillie 2006

²⁹ Couri et al. 2012; Hipp and Atala 2008; Witkowska-Zimny and Wrobel 2011

³⁰ Serafini and Verfaillie 2006

³¹ Couri et al. 2012

³² Hipp and Atala 2008

³³ Friedenstein et al. 1968

nach gradueller Entfernung der hämatopoetischen Zellen eine Population von Plastik-adhären, Fibroblasten-ähnlichen Zellen, die in der Lage waren, in die Chondrozyten und Osteoblasten zu differenzieren, und nannten sie „colony forming fibroblasts“.³⁴ Ihre Nomenklatur ist bisher nicht einheitlich festgelegt, sie werden aufgrund ihrer mesenchymalen Vorläufer-Eigenschaften als „Mesenchymale Stammzellen“ (MSCs)³⁵ bezeichnet oder als „Multipotente Mesenchymale Stromazellen“.³⁶ Besonders vielversprechend sind MSCs für die Forschung, da sie aus fast allen Geweben des Körpers isoliert werden und vergleichsweise effizient in Kultur gehalten und vermehrt werden können.³⁷ Die Fähigkeiten von MSCs zur Geweberegeneration konnten sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* durch Differenzierung in mesenchymale Gewebe (Knochen, Knorpel und Fett) nachgewiesen werden.³⁸ Darüber hinaus wurde auch die Fähigkeit der MSCs beschrieben, *in vitro* in Gewebe endodermalen sowie ektodermalen Ursprungs auszudifferenzieren.

Eine Zellpopulation muss drei von der International Society of Cell Therapy (ISCT) vorgeschlagenen Minimalkriterien erfüllen, um als MSCs definiert werden zu können: 1) Die Fähigkeit *in vitro* zur Differenzierung in die mesenchymale Gewebe Knochen, Knorpel und Fett, 2) eine fibroblastenähnliche Morphologie sowie eine Plastikadhärenz der Zellen unter Standardkulturbedingungen und 3) gewisse Mindestanforderung an die An- bzw. Abwesenheit bestimmter Oberflächenmarker in der Zellpopulation: Über 95% der MSCs müssen positiv für CD90, CD105 und CD73 sein, während unter 2% der Zellen positiv für die hämatopoetischen oder endothelialen Marker CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79α oder CD19 und HLA-DR sein dürfen.³⁹

Die plastikadhären MSC Populationen sind heterogen. Für das Knochenmark (KM) als Stammzell-Kompartiment sowie für die Körperperipherie als weiteres Kompartiment wird eine perivaskuläre Lokalisation undifferenzierter MSCs vermutet. Perizyten oder Fibroblasten (die viele Charakteristika von MSCs teilen) könnten das *in vivo* Äquivalent der *in vitro* charakterisierten MSCs darstellen. Eine Transdifferenzierungskapazität *in vivo* von MSCs ist in der Fachliteratur beschrieben, bisher aber nicht klar bewiesen worden.⁴⁰ Neben der Differenzierung in die mesenchymalen Gewebe Knorpel, Knochen und Fett, können MSCs

34 Friedenstein et al. 1968; Wong 2011

35 Caplan 1991

36 Horwitz et al. 2005

37 Shi et al. 2010; Uccelli et al. 2008

38 Caplan 2007; Bianco et al. 2008

39 Dominici et al. 2006

40 Lindner et al. 2010

auch in andere mesenchymale Gewebe wie Sehne und Skelettmuskel differenzieren⁴¹, siehe Abbildung 1.

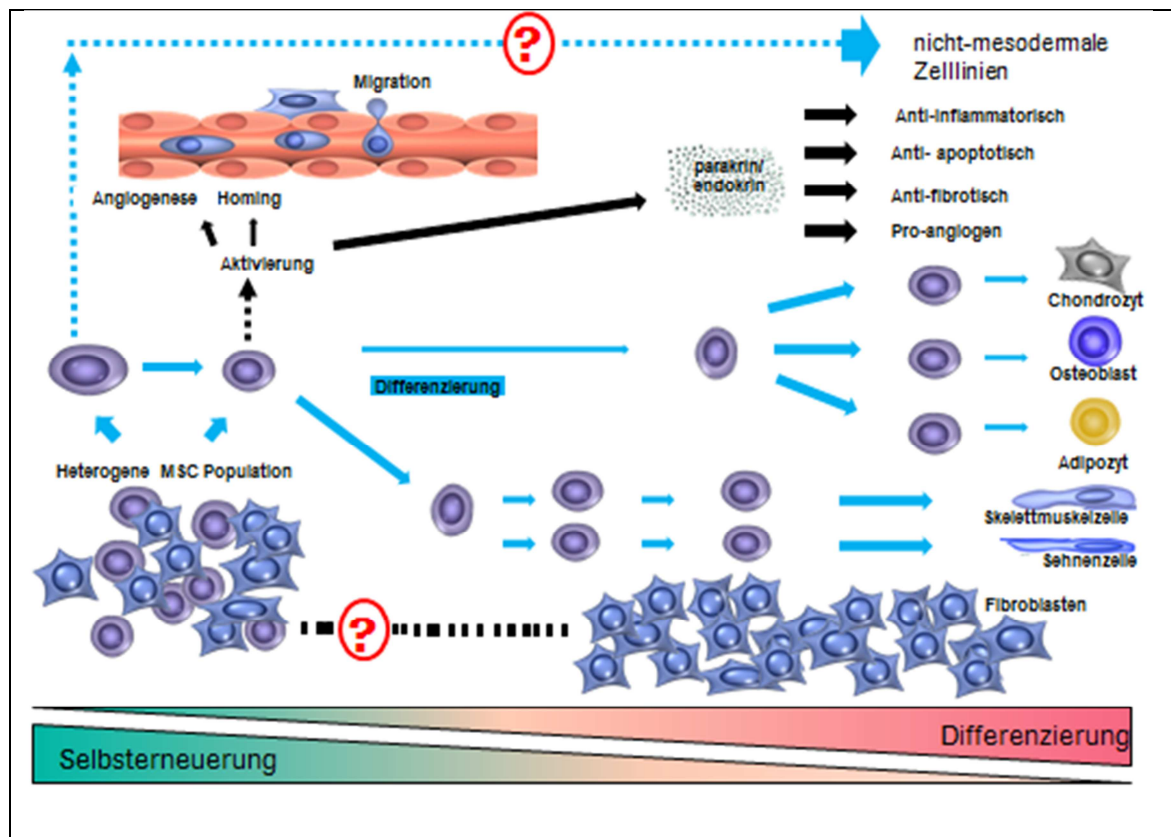


Abbildung 1: MSC Biologie im Bild, modifiziert nach Neubauer et al. 2012; Lindner et al. 2010

Erläuterung zur Abbildung 1.: MSCs co-lokalisieren nach systemischer Verabreichung am Ort der Entzündung und transmigrieren möglicherweise durch die Blutgefäßwand. Sie wirken therapeutisch durch Regulierung der Immunmodulation, Stimulierung der Proliferation der Wirtsgewebezellen oder lokaler Vorläuferzellen, Inhibition der Apoptose, Stimulierung angiogener Prozesse, Induktion der Differenzierung oder Re-Differenzierungsprozesse. Es wird angenommen, dass MSCs hauptsächlich über die Freisetzung parakriner und endokriner Faktoren wirken, die eine unterstützende und stimulierende Umgebung für endogene Reparaturen herstellen. In vitro und in vivo Differenzierung von MSCs in mesenchymale Gewebe ist publiziert worden, während die Transdifferenzierungskapazität noch nicht abschließend bewiesen wurde. Perizyten oder Fibroblasten könnten das in vivo Äquivalent zu MSCs sein.

Es wurde gezeigt, dass MSCs in der Lage sind, chemotaktisch an Orte entzündlichen Gewebes zu wandern (homen) und dort lokal regulierend auf Immunantworten zu wirken.⁴² Andere Studien zeigen, dass die erwünschten therapeutischen Effekte nicht von der Lokalisation der Zellen abhängen, da über 90% der i.v. applizierten Zellen in der Lunge

41 Caplan 2005

42 Pistoia and Raffaghello 2010; Bianco et al. 2008

gefangen werden⁴³ und maximal 0,5% der MSCs an den Ort der Entzündung homen⁴⁴. Diese Unterschiede lassen sich laut Neubauer⁴⁵ durch sowohl durch die Sensitivität und Auflösung der Detektionsmethode als auch durch unterschiedliche MSC Expansionsmethoden erklären, da die für das Homing wichtigen Liganden und Rezeptoren sich während der Expansion in Kultur verändern oder ganz verloren gehen. Auch in der Therapie von neurologischen Störungen gibt es Hinweise, dass MSCs in der Lage sind, den Krankheitsstatus zu verbessern, auch wenn nicht klar ist, ob dies durch Transdifferenzierung oder trophische Effekte erfolgt. So wurde deshalb vorgeschlagen⁴⁶, weiter zu untersuchen, ob MSCs tatsächlich zur Zellerneuerung beitragen oder deren positiven therapeutischen Effekte durch parakrine Faktoren zustande kommen, die eine partielle funktionale Erholung neurologischer Störungen bewirken. Es wurde wiederholt gezeigt, dass die MSC-Therapie zu einer Reduktion der Entzündung, Apoptose und Fibrose in vielen Krankheitsmodellen führt, ohne dass es zu MSC Differenzierung oder Engraftment in den verletzten Geweben kam. Dies gab Anlass zu einem Paradigmenwechsel im Verständnis der MSC-Biologie *in vivo*: Es wird postuliert, dass vorrangig die trophischen Faktoren den Erfolg der MSC-Therapie ausmachen, einschließlich der Sekretion von Cytokinen, die parakrin als auch endokrin wirken können.⁴⁷ Dieser Paradigmenwechsel im Verständnis der Wirkung der MSC-Therapie weg von der Differenzierungskapazität einerseits und dem Homing und Engraftment im Zielgewebe andererseits hin zu den trophischen Mechanismen als deren biologische Funktion *in vivo* ist laut Ankrum⁴⁸ der Grund, weshalb es in den klinischen Studien eine Verschiebung von der lokalen zur systemischen Applikation gegeben hat. Auch nach Lindner⁴⁹ besteht Konsens, dass in der Stammzellbiologie nicht die Plastizität der MSCs sondern deren parakrine Effekte nach Applikation für die *in vivo* Ergebnisse verantwortlich sind. Nicht nur die Nomenklatur und die Frage, ob der Zellersatz oder die parakrinen Faktoren den Erfolg der MSC-Therapien ausmachen, sind umstritten. Auch die Dauer der *in vivo* Persistenz und die beste Art der MSC Verabreichung werden weiterhin kontrovers diskutiert. Bianco⁵⁰ bezeichnet diese Abweichungen in den Konzepten und translatorischen Ansätzen der MSC Biologie als „Yin und Yang“ der MSC Forschung, siehe Abbildung 2.

43 Barbash et al. 2003a

44 Lee et al. 2009

45 Neubauer et al. 2012

46 Serafini and Verfaillie 2006

47 Poll et al. 2008

48 Ankrum and Karp 2010

49 Lindner et al. 2010

50 Bianco et al. 2013

YIN		YANG
Skelettale Stammzellen	Name	Mesenchymale Stammzelle/ Mesenchymale Stromazelle
Skelettalem Gewebe	Vorläufer von	Skelettalem und nicht- skelettalem Gewebe
Knochenmark	Lokalisation	Ubiquitär
Einzelzellen, <i>in vivo</i>	Analysiert als	Nichtklonale Kulturen, <i>in vitro</i>
Geweberegeneration	Funktion nach Verabreichung	Chemisch produzierte Eigenschaften
Regeneration durch gegraftete Zellen	Nutzen	Parakrine Veränderung der Wirtszellen
Transplantation	Verabreichung durch	Infusion
Engraftment	Verabreichung für	Embolisierung
Dekaden	Voraussichtliche <i>in vivo</i> Persistenz	Stunden
Stammzelle	Definition als	Drogerie
Lebende Zellen	Effektiv <i>in vivo</i> als	Sterbende Zellen

Abbildung 2: Das Yin und Yang von MSCs: Zusammenfassung der Abweichungen verschiedener Konzepte und translationaler Ansätze, modifiziert nach Bianco et al. 2013

1.1.1.4.2 Immunprivilegierung

MSCs üben einen immunmodulatorischen Effekt aus, was sie unter den adulten Stammzellen für die regenerative Medizin besonders hervorhebt.⁵¹ Der Immunphänotyp von MSCs wird als major histocompatibility complex (MHC) I positiv und MHC II negativ beschrieben.⁵² Laut Ryan⁵³ sind es drei umfassende Mechanismen, die hauptsächlich zum immunmodulatorischen Effekt der MSCs beitragen:

⁵¹ Fiorina et al. 2009; Newman et al. 2009; Shi et al. 2010

⁵² Javazon et al. 2004

⁵³ Ryan et al. 2005

- 1) MSCs sind hypoimmunogen, ihnen fehlt oft eine MHC-II Expression sowie die Expression der kostimulatorischen⁵⁴ Moleküle CD40, CD80 und CD86.
- 2) MSCs verhindern eine T-Zell Antwort indirekt durch Regulierung der dendritischen Zellen und direkt durch Störung der natural killer (NK) Zell- und der CD8+ und CD4+ T Zell- Funktion.
- 3) MSCs induzieren eine immunsuppressive, lokale Mikroumgebung durch die Produktion von Prostaglandinen und Interleukin-10 (IL-10) sowie durch die Expression von Indoleamin 2,3-Dioxygenase (IDO), die das lokale Tryptophan-Milieu vermindert.

Neben diesen Haupteffekten gibt es noch weitere MSC Wirkungen auf die Zellen der angeborenen und erworbenen Immunität, siehe Abbildung 3.

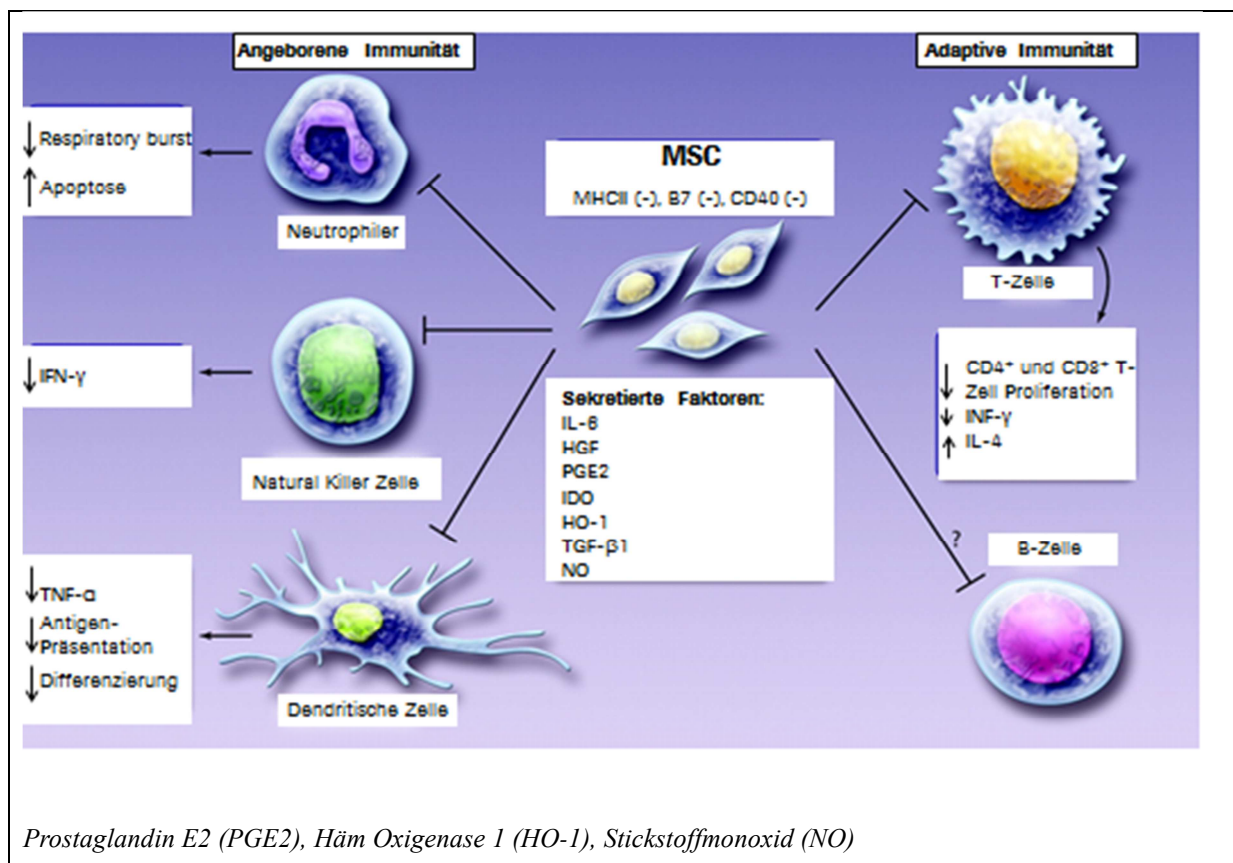


Abbildung 3: MSC Interaktionen mit Immunzellen, modifiziert nach Williams and Hare 2011

Die Immunmodulation von MSCs kann mit der maternalen Toleranz des fötalen Allografts verglichen werden, im Gegensatz zu der Immun-Umgehung von Tumorzellen.⁵⁵ Wegen

⁵⁴ Auch wenn die Expression geringer Level an MHC-I Antigenen T-Zellen aktivieren kann, kann durch die Abwesenheit kostimulatorischer Moleküle kein sekundäres Signal initiiert werden, so dass die T-Zellen inaktiv bleiben (Javazon et al. 2004).

fehlender Erkennung durch das Wirts-Immunsystem und fehlender Immunantwort werden MSCs auch als hypoimmunogen bezeichnet.⁵⁶ Durch diese Immunprivilegierung bedingt, findet keine oder nur eine verminderte Immunantwort bei allogener Gabe von MSCs statt.⁵⁷ Es wurde sogar gezeigt, dass MSC Engraftment über die Speziesgrenzen hinweg stattfinden kann.⁵⁸ Ihre regulierende Wirkung bei entzündlichen Prozessen machen MSCs unter anderem für die Behandlung von (Auto)-Immunerkrankungen nutzbar.⁵⁹

1.1.1.4.3 MSC Therapie

Die Eigenschaften von Stammzellen prädestinieren diese dazu, sie in pathologischen Zuständen mit Gewebeschäden einzusetzen.⁶⁰ Das Ziel der regenerativen Stammzelltherapie ist es, beschädigte Gewebe zu behandeln, ohne dass es zu Zelltod oder zu ungewollt verändertem Gewebe kommt.⁶¹ Der therapeutische Nutzen humaner MSCs wurde bereits für die Therapie unterschiedlicher Erkrankungen im Modellorganismus der Maus gezeigt. So wurde z. B. bei Herzinfarkt⁶², Sepsis⁶³, Lungenfibrose⁶⁴ und Diabetes mellitus Typ 1,⁶⁵ eine Verbesserung des Krankheitsstatus beschrieben. Während es beim Menschen zur Zeit noch keine anerkannten Behandlungen mit embryonalen Stammzellen gibt, werden adulte Stammzellen seit Jahren in der Klinik eingesetzt, z. B. die hämatopoetische Stammzelltherapie seit über 50 Jahren als Knochenmarktransplantate in der Behandlung von Leukämien.⁶⁶ MSCs sind eine hochregulierte selbsterneuernde Population von adulten Stammzellen mit wirksamen Mechanismen, um die allogene Abstoßung zu verhindern, was sie zu attraktiven Zellen für die Stammzelltherapie macht.⁶⁷ Obwohl viele Experten sich darüber einig sind, dass die MSC-basierte Zelltherapie eine noch unreife Therapieform darstellt, gibt es eine wachsende Anzahl an Zelltherapiestudien in Wissenschaft und Wirtschaft.⁶⁸ Bei verschiedenen Krankheiten wie Graft-versus-host Krankheit (GvHD), Herzkrankheiten, Osteogenesis imperfecta, metachromatischer Leukodystrophie, Hurler

55 Ryan et al. 2005

56 Liu and Han 2008

57 Pistoia and Raffaghello 2010; English and Mahon 2011; Anzalone et al. 2011; Abumaree et al. 2012

58 Li et al. 2012; English and Mahon 2011

59 Newman et al. 2009; Uccelli et al. 2006; Uccelli et al. 2008; Bianco et al. 2008

60 Godfrey et al. 2012

61 Orlic et al. 2003; Parekkadan and Milwid 2010

62 Lee et al. 2009

63 Nemeth et al. 2009

64 Ortiz et al. 2003; Ortiz et al. 2007

65 Lee et al. 2006

66 Godfrey et al. 2012; Parekkadan and Milwid 2010

67 Ryan et al. 2005

68 Neubauer et al. 2012

Syndrom, Myokardinfarkt, Leberversagen, Leberzirrhose, multipler Sytematrophie, Diabetes mellitus und Rückenmarksverletzungen wurden MSCs in klinischen Studien mit teils positiven Erfolgen eingesetzt.⁶⁹ Die Mechanismen, mit denen MSCs die Funktionen ischämischen Gewebes verbessern und die Effekte des Zelltods abschwächen, sind Differenzierung, Zellfusion, Sekretion von Zytokinen oder parakrinen Effekten. Es konnte gezeigt werden, dass hMSCs aus KM die Funktionalität ischämischen Gewebes durch Förderung der Neovaskularisierung, Inhibition von Apoptose, anti-inflammatorische Effekte und Stimulierung endogener Zelldifferenzierung und –proliferation verbesserten.⁷⁰ In Abbildung 4 sind die Faktoren aufgelistet, die ursächlich für diese therapeutischen Effekte in der MSC-Therapie sind. In Abbildung 5 ist eine Zusammenfassung der dualen Rolle von MSCs in traumatischen Gewebeschäden dargestellt, in denen die MSCs einerseits durch parakrine Faktoren die Entzündung beenden und andererseits zusätzlich eine verbesserte Mikroumgebung für das Überleben reparativer (Wirts-) Stammzellen bereitstellen.⁷¹

69 Wong 2011; Serafini and Verfaillie 2006; Ren et al. 2012

70 Burdon et al. 2011

71 Hong et al. 2012

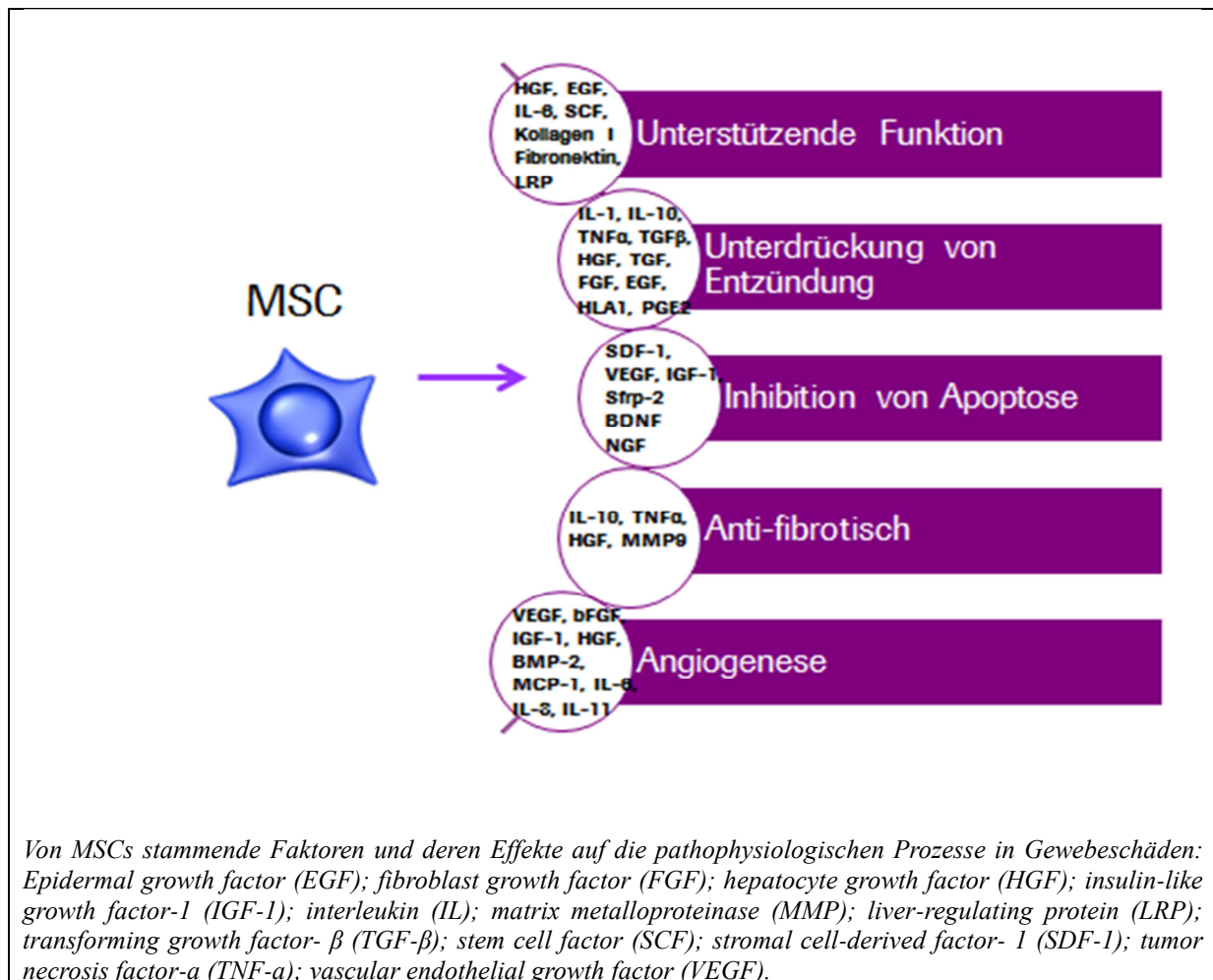


Abbildung 4: Trophische Mechanismen der MSC Therapie: Modifiziert nach Lin et al. 2011; Poll et al. 2008

Bestimmte Faktoren sind für das Migrationspotential und das Homing von entscheidender Bedeutung, wie z. B. der Rezeptor CXCR4 und sein Ligand SDF-1.⁷² Die Expression von CXCR4 sinkt kontinuierlich innerhalb einiger Passagen in Kultur, was das Homing- und Engraftment-Potential kultivierter MSCs in den meisten Zelltherapiestudien, in denen die Expansion unumgänglich ist, verringert.⁷³ Es wurden auch andere Faktoren beschrieben, die für Chemotaxis und Homing wichtig sind, siehe Tab. 1.

Tab. 1: Molekulare Interaktionen, die Migration und Engraftment von MSCs an den Ort der Entzündung begünstigen, modifiziert nach Poll et al. 2008

MSC Rezeptor / Enzym	Gewebs-Ligand /Substrat	Funktion
c-met	HGF	Chemotaxis
CXCR4	SDF-1	Chemotaxis

⁷² Yu et al. 2013

⁷³ Ahmadbeigi et al. 2010; Honczarenko et al. 2006

CX3CR1	CX3CL1 (Fractalkine)	Chemotaxis
MMP2	Kollagen, Gelatine	Engraftment
MMP9	Kollagen, Gelatine	Engraftment
CD44	Hyaluron Säure	Chemotaxis
PDGF-Rezeptor (a,b)	PDGF-BB	Chemotaxis
PDGF- Rezeptor (a,b)	PDGF-AB	Chemotaxis
EGF-Rezeptor	EGF	Chemotaxis
FGF-Rezeptor-2	FGF2	Chemotaxis
IGF-Rezeptor	IGF-1	Chemotaxis
RANTES-Rezeptor	RANTES	Chemotaxis
MCP-1-Rezeptor	MCP-1	Chemotaxis
CCR2/3/4	CXCL8	Chemotaxis
<i>Platelet-derived growth factor (PDGF), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)</i>		

KM ist die Quelle für MSCs, die am häufigsten in klinischer Forschung und Anwendung eingesetzt wird. Gründe dafür sind der relativ einfache Zugang, die hohe Zahl an Zellen, die man pro KM-Aspirat gewinnen kann, und die umfangreichen Erfahrungen, die durch die konventionellen Knochenmark Transplantationen gewonnen wurden.⁷⁴ Das Risiko viraler Kontaminationen ist sehr hoch und mit steigendem Alter nimmt die Anzahl an MSCs ab, die aus KM gewonnen werden kann, weshalb in den letzten Jahren nach alternativen MSC-Quellen gesucht wurde, die eine ebenfalls hohe oder sogar höhere Proliferationsrate, eine gute Differenzierungsfähigkeit und ein geringeres Risiko viraler Kontaminationen haben.⁷⁵ Gewebe wie Fett⁷⁶, Nabelschnurblut⁷⁷, Nabelschnurgewebe⁷⁸ und Amnionmembran⁷⁹ sind MSC-Quellen, die diese Voraussetzungen erfüllen. Besonders die Möglichkeit, fötales Gewebe, das unter normalen Umständen nach einer Geburt verworfen wird, ohne ethische Bedenken und mit einer hohen Ausbeute an MSCs relativ einfach und häufig erhalten zu können, macht die MSC-Quellen Amnionmembran und Nabelschnur besonders attraktiv. Ihre Anwendung zeigen neue Perspektiven auf, die Anzahl an klinischen Anwendungen zu erhöhen.⁸⁰

74 Couri et al. 2012

75 Romanov et al. 2003

76 Constantin et al. 2009

77 Gluckman et al. 2011

78 Carvalho et al. 2011

79 Bacenkova et al. 2011; Alviano et al. 2007

80 Alviano et al. 2007

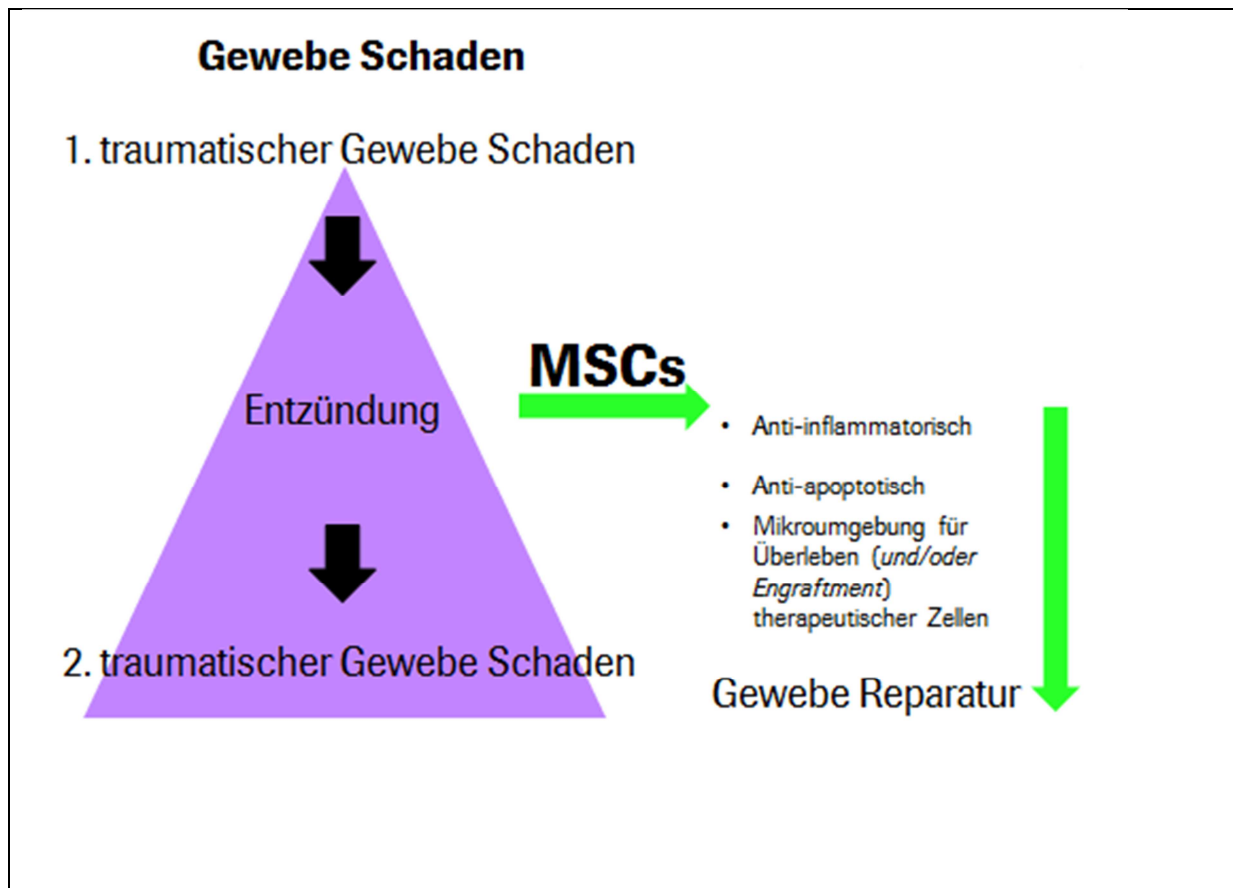


Abbildung 5: Anti-inflammatorische Effekte von MSCs in Gewebereparatur. Modifiziert nach Hong et al. 2012

Erläuterung zur Abbildung 5: Eine traumatische Gewebsverletzung induziert eine erste Entzündungsantwort, die wiederum einen sehr viel stärkeren, entzündungsbedingten Sekundärschaden verursacht. Bleibt die Entzündungsphase erhalten, wird die Wundheilung verzögert und die Entzündung kann chronisch werden. Werden MSCs innerhalb der frühen Phase der Entzündung gegeben, kann eine anti-inflammatorische Umgebung erzeugt werden, die einen entzündungsbedingten Sekundärschaden verhindert. Unter diesen anti-inflammatorischen Bedingungen könnte die Apoptose von Wirtszellen abgewandt werden, Zellschrott und tote Zellen könnten von Makrophagen entfernt werden. Demnach können MSCs eine duale Rolle in der Gewebsreparatur spielen, indem sie die verheerende Entzündung beenden sowie eine verbesserte Mikroumgebung für das Überleben reparativer (Wirts-) Stammzellen bereitstellen.

1.1.1.4.4 Sicherheit der MSC Therapie

Auch wenn Stammzellen ein großes Potential für neue Therapien bergen, so ist ihre tumorigene Aktivität ein Hauptbedenken⁸¹ gegen ihren klinischen Einsatz.⁸² Adulte Stammzellen scheinen nicht dasselbe hohe tumorigene Leistungsvermögen wie ESCs oder

81 Die Erkennung allogener Zellen durch das Wirts-Immunsystem kann ebenfalls eine Limitierung der Anwendbarkeit zellbasierter Therapieformen darstellen. (Mehr zu MSCs in Wechselwirkung mit dem Immunsystem siehe "Immunprivilegierung" in Kapitel 1.1.1.4).

82 Xu et al. 2004

iPSCs zu besitzen, dennoch besteht die Möglichkeit einer Tumormutation, was wahrscheinlich der gravierendste Nachteil für den klinischen Einsatz sein dürfte.⁸³ Tatsächlich ist beschrieben worden, dass murine MSCs (mMSCs) in Kultur zu zytogenetischen Veränderungen neigen: Tolar⁸⁴ konnte bei MSCs aus dem KM von BALB/c sowie von C57BL/6 Mäusen nach einigen Passagen *in vitro* Transformationen entdecken. Er zog daraus den Schluss, dass kulturbedingte zytogenetische Veränderungen bei mMSCs weder Mausstamm-spezifisch noch ein seltenes Ereignis sind. Wurden die mMSCs in Mäuse injiziert, starben diese oder es bildeten sich Sarkoma-Foci in der Lunge und in einigen Tieren zusätzlich in den Extremitäten.⁸⁵ Dass mMSCs nach langer Kultivierung *in vitro* spontane Transformationen erfahren, haben auch andere Gruppen gezeigt.⁸⁶ Im Gegensatz dazu wurden durch Vilalta⁸⁷ hMSCs in Mäuse transplantiert und deren Verbleib über acht Monate im Wirtstier untersucht: Die Zellen erreichten einen stabilen Zustand, die Population proliferierte nicht nach Implantation und weder chromosomale Abnormitäten noch Tumoren⁸⁸ konnten innerhalb dieser Zeit *in vivo* gefunden werden. Es wurde weiterhin gezeigt, dass eine FUS-CHOP⁸⁹ Expression in einem p53-defizienten Hintergrund ausreicht, um Liposarkome durch mMSCs, nicht aber durch hMSCs auszulösen. Dies lässt vermuten, dass es einer höheren Anzahl an Mutationen in hMSCs bedarf, um die Zellen in Richtung Liposarkom entarten zu lassen.⁹⁰ hMSCs scheinen, im Gegensatz zu mMSCs, sichere Kandidaten für eine autologe Zelltherapie zu sein.⁹¹ Dennoch wurden Sarkomformationen nach MSC Therapie, besonders bei mMSCs aber auch bei hMSCs, gefunden, siehe Tab. 2:

Tab. 2: Sarkomamodelle aus transformierten MSCs, nach Rodriguez et al. 2012a

Sarkoma Typ	Onkogenes Ereignis	Murine oder humane MSCs	MSC Quelle	Referenz
Ewing's Sarkom	EWS-FLI-1	Maus	KM	Castillero-Trejo et al. 2005; Riggi et al. 2005
Alveoläres Rhabdomyosarkom	PAX-FKHR und p53- Inaktivierung	Maus	KM	Ren et al. 2008
Mixoides	FUS-CHOP	Maus	KM	Riggi et al. 2006

83 Macisaac et al. 2012

84 Tolar et al. 2007

85 Tolar et al. 2007

86 Li et al. 2007; Miura et al. 2006

87 Vilalta et al. 2008

88 Der Verdacht liegt nahe dass hMSCs als Xenograft im Mausmodell stärkere Immunantworten als mMSCs auslösen könnten (was die niedrigere Tumorigenität in diesem Modell erklären könnte), jedoch wurde gezeigt, dass MSCs auch artübergreifend nur sehr geringe immunogene Eigenschaften besitzen (Chiu 2005).

89 Reziproke Translokation myxoider Liposarkome, die den Transkriptionsfaktor CHOP auf Chromosom 12 einschließt, sowie das FUS (fused) Gen auf Chromosom 16 (Kuroda et al. 1995).

90 Rodriguez et al. 2011

91 Vilalta et al. 2008

Liposarkom				
Osteosarkom	p53 und Rb Inaktivierung	Maus	KM	Calo et al. 2010
Leiomyosarkom	p53 und Rb Inaktivierung	Maus	Fett	Rubio et al. 2010
Fibröses Histiozytom	Wnt Signalweg Inaktivierung	Mensch	KM	Matushansky et al. 2007
Keine Tumoren — Genexpression ähnlich dem Ewings Sarkom	EWS-FLI-1	Mensch	KM	Riggi et al. 2008

Bezüglich der spontanen Mutation von hMSCs gibt es widersprüchliche Veröffentlichungen: Gezeigt wurde die spontane Transformation von hMSCs aus dem KM nach Langzeit-Kultivierung.⁹² Im Gegensatz dazu wurde das Fehlen von Transformationen nach langer Kultivierung *in vitro* wie auch schon bei Vilata⁹³ bei anderen Gruppen beobachtet,⁹⁴ auch wenn Tarte⁹⁵ das Auftreten von Aneuploidien beschreibt, was aber zu keiner Malignität *in vivo* führte. Dies ist ein sehr wichtiger Aspekt der MSC-Therapie Sicherheit, da die *ex vivo* Expansion unabdingbare Voraussetzung ist, um diese Zellen in Zell-basierten Therapien nutzen zu können.⁹⁶ HMSCs aus Fett wurden von Lopez-Iglesias⁹⁷ in ein tumoranfälliges Mausmodell, die immundefiziente SCID-Maus, s. c. injiziert und sowohl kurzzeitig (2 und 4 Monate) als auch langfristig (17 Monate) beobachtet. Es konnte keine *in vivo* Tumorformation gefunden werden, weder bei jungen Wirtstieren, noch bei alten SCID Mäusen. Dies deckt sich auch mit anderen Studien.⁹⁸

Die hMSC Transformation könnte entweder ein häufiges Ereignis sein, eine einem indirekten Effekt zugrundeliegende Zellkontamination in den jeweiligen Labors⁹⁹, oder durch spezifisch pathologische Gegebenheiten induziert sein.¹⁰⁰ Die Rolle von MSCs in der Tumorgenese könnte aber auch eine indirekte sein: Da einige (wenige) MSCs an den Ort der Entzündung homen und dort, wenn die Rahmenbedingungen es zulassen und insbesondere wenn Stressbedingungen vorliegen, das Gleichgewicht durcheinander bringen, könnte das ebenfalls eine Malignitätsquelle sein.¹⁰¹ Es wurde gezeigt, dass KM hMSC, die nach einer

92 Rosland et al. 2009; Wang et al. 2005

93 Vilalta et al. 2008

94 Bernardo et al. 2007; Choumerianou et al. 2008; Gou et al. 2010; Tarte et al. 2010; Wang et al. 2005

95 Tarte et al. 2010

96 Rodriguez et al. 2012a

97 Lopez-Iglesias et al. 2011

98 Tarte et al. 2010

99 Garcia et al. 2010

100 Rodriguez et al. 2012a

101 Rodriguez et al. 2012a

Infektion mit *Helicobacter pylori* in den Magen migriert waren, die Ursache für Magenkrebs sein könnte.¹⁰² Eine weitere Tumor-fördernde Wirkung von MSCs ist ihre Fähigkeit, das Immunsystem zu unterdrücken.¹⁰³ Diese Fähigkeit ist einerseits von Interesse (beispielsweise in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen), andererseits könnte es für Patienten mit Krebs durch eine Runterregulierung des Immunsystems ein schnelleres Tumorwachstum bedeuten.¹⁰⁴ In Abbildung 6 sind diese und weitere indirekte Mechanismen zusammengestellt, die theoretisch während einer MSC-Therapie zu erhöhtem Tumorwachstum führen könnten.

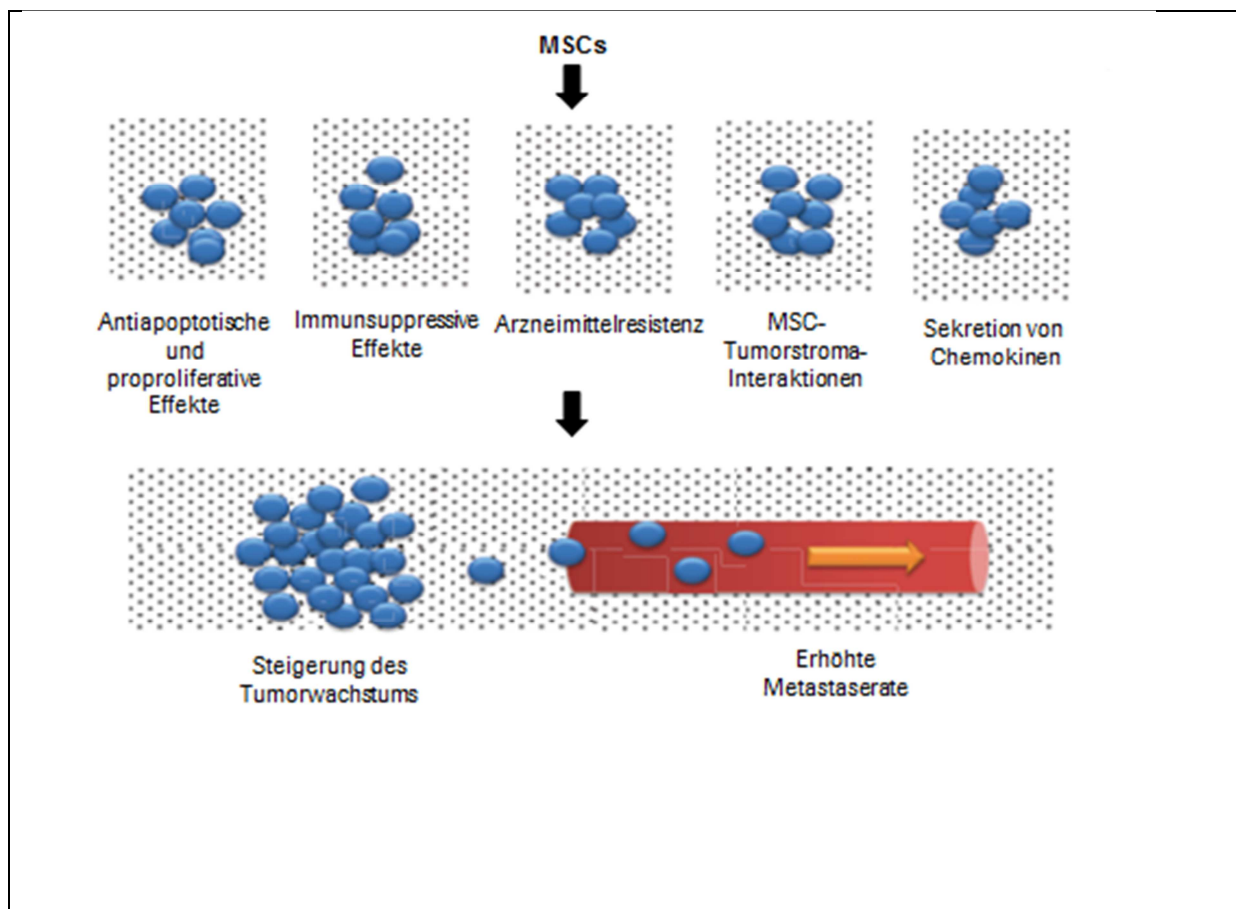


Abbildung 6: Theoretisch mögliche Mechanismen des indirekten Eingreifens von MSCs in Tumorwachstum während einer MSC-Therapie, modifiziert nach Wong 2011

Gleichwohl wurde von Prockop¹⁰⁵ unter bestimmten Bedingungen eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit maligner Transformationen in der MSC-Therapie prognostiziert. Lalu¹⁰⁶ hat eine Metastudie von MSC-Therapien mit insgesamt 1021 Teilnehmern mit klinischen

102 Houghton et al. 2004

103 Le Blanc and Ringden 2005

104 Wong 2011

105 Prockop et al. 2010

106 Lalu et al. 2012

Befunden von ischämischem Schlaganfall, Morbus Crohn, Kardiomyopathie, Myokardinfarkt, GvHD und mit gesunden Freiwilligen durchgeführt. Malignität trat ausschließlich in Studien mit bereits bestehenden bzw. der Studie vorausgegangenen Malignitäten auf, d. h. es gab keine neu aufgetretenen Tumorerkrankungen in den Studien. Acht Studien waren randomisierte Kontrollstudien mit 321 Patienten. Meta-Analyse dieser Kontrollstudien konnte keinen statistischen Zusammenhang zwischen akuter Infusionstoxizität, Organsystemkomplikationen, Infektionen, Tod oder Malignitäten feststellen. Ein Zusammenhang konnte nur zwischen kurzzeitigem Fieber und MSC-Injektionen beobachtet werden. Mittlerweile zeigen viele Studien, dass einige Patienten eine Verbesserung ihres Krankheitsstatus durch die MSC Therapie erfahren haben und es gibt viele gute Ergebnisse, sowohl was die Sicherheit als auch die Lebensqualität der Patienten angeht.¹⁰⁷ Basierend auf den bisherigen klinischen Studien kann die MSC Therapie als sicher angesehen werden, dennoch sollten größer angelegte Studien mit ausführlichen Berichten über die Nebenwirkungen durchgeführt werden, um das Sicherheitsprofil von MSC-Therapien zu vervollständigen.¹⁰⁸

107 Rodriguez et al. 2012a

108 Lalu et al. 2012

1.2 Pharmakokinetik

1.2.1.1 Allgemein

Die traditionelle Pharmakokinetik (PK) untersucht den Verbleib von Stoffen oder Toxinen, die von außen in einen lebenden Organismus gegeben werden. Dies wird beschrieben durch Umfang und Anteil von Absorption, Verteilung, Verstoffwechslung und Ausscheidung des Stoffes.¹⁰⁹ Diese Prozesse werden mit ADME (absorption, distribution, metabolism, excretion) bezeichnet.

1.2.1.2 Target-mediated drug disposition

Levy¹¹⁰ führte den Fachbegriff TMDD (Target Mediated Drug Distribution) für einige Stoffe mit einer komplexen, nicht-linearen PK ein: TMDD liegt vor, wenn ein relativ zur Dosis signifikanter Anteil eines Arzneimittels sich mit hoher Affinität an ein pharmakologisches Target bindet, so dass sich die Interaktion in den pharmakologischen Merkmalen dieses Stoffes widerspiegelt.¹¹¹ Levy hatte beobachtet, dass das pharmakologische Target des Stoffes selbst für diese komplexe PK ursächlich war: Plasmakonzentrationen der meisten Stoffe übersteigen Rezeptor- oder Zielkonzentrationen, während Stoffe, die eine TMDD zeigen, mit hoher Affinität und zu einem relativ zur Dosis signifikanten Grad an ihr Ziel gebunden werden, was das zeitliche Profil der Plasmakonzentration beeinflusst.¹¹²

1.2.1.3 Pharmakokinetik von Mesenchymalen Stammzellen

1.2.1.4 Methoden

Die Untersuchung der Pharmakokinetik der Zelltherapie kann sich keiner etablierten pharmakokinetischen Methoden bedienen, da Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion der Zellen nicht, wie beispielsweise bei der klassischen Therapie mit pharmazeutischen Molekülen, direkt in den Körperflüssigkeiten gemessen werden können.¹¹³

Die Bioverteilung von zellulären Produkten im Menschen zu detektieren, kann sich als eine Herausforderung herausstellen. Präklinische Zelltherapiestudien mit verschiedenen Risikoprofilen der Zellen und Injektionsstellen werden sehr wichtig für die Zelltherapie sein.

¹⁰⁹ Luo et al. 2012

¹¹⁰ Levy 1994

¹¹¹ Mager 2006.

¹¹² Mager 2006

¹¹³ Sharpe et al. 2012

Bei präklinischen wie auch bei klinischen Studien in der Zelltherapie ist es wesentlich, den Aufenthaltsort *in vivo* der transplantierten Zellen zu überwachen, wofür die Festlegung geeigneter Marker unabdingbar ist. Um die Zulassung für Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs) zu erlangen, ist der Zeitpunkt des Engraftments oder die Clearance mit gleichzeitigem positivem klinischen Ergebnis zur Verifizierung der für den *in vivo* Effekt zuständigen Zellpopulation zu definieren.¹¹⁴ Nach Injektion von MSCs in einen Organismus ist die Anzahl der noch im Blut zirkulierenden Zellen schon nach kurzer Zeit unter dem Detektionslimit der bisher verwendeten Methoden. Eine Analysemethode, die den Nachweis weniger oder einzelner Zellen im Blut ermöglicht ist, somit unerlässlich.¹¹⁵ Techniken, um spezielle Zellen aus der Gesamtpopulation der vorhandenen Zellen anzureichern, wie das Fluorescence-Activated-Cell-Sorting (FACS) und das Magnetic-Activated-Cell-Sorting (MACS), reichern den Anteil der Zielzellen zwar an, das Detektionsminimum ist allerdings zu hoch um sehr selten vorkommende Zellen analysieren zu können. Allen¹¹⁶ konnte mit einer Kombination von MACS und FACS eine Sensitivität von 10^5 Zellen erreichen. Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (Polymerase-chain-reaction, PCR) können sehr wenige Zellen, z.B. in einem Organ, detektiert werden; allerdings kann man diese Analyse nur am getöteten Tier vornehmen und die Zielzellen nach der PCR nicht weiter analysieren. Eine weitere Detektionsmethode ist die Immunhistochemie (IHC). Die Vorteile dieser Methode sind, dass MSC, die sich in dem analysierten Organ befinden, auf verschiedene Oberflächenmarker analysiert werden können, und dass ihre Lage innerhalb des Organs genau bestimmt werden kann. Auch wenige Zellen können hierbei gefunden und analysiert werden, allerdings müssen auch für diese Methode die Mäuse getötet werden, dies ermöglicht es also nicht die injizierten Zellen in einem Tier über einen gewissen Zeitraum zu verfolgen. Das Rare Cell System (RCS) ist eine Methode, mit der man die injizierten MSCs sequentiell im Blut nachweisen kann. RCS erlaubt eine Aussage über die Häufigkeit und über das Antigen-Profil der hMSCs im Blut der transplantierten Tiere zu gewählten Zeitpunkten. Das Prinzip der RCS ist, dass nach der Blutentnahme die Erythrozyten, welche den größten zellulären Anteil des Blutes darstellen, aufgelöst werden. Die mononukleären Zellen werden somit angereichert und können auf einer Oberfläche (z.B. auf einem Objektträger) immobilisiert werden. Anschließend können diese unter dem Mikroskop quantitativ sowie qualitativ (mittels

114 Sharpe et al. 2012

115 Pantel et al. 2008

116 Allan et al. 2005

spezifischer Antikörper) charakterisiert werden.¹¹⁷ Das RCS wurde ursprünglich entwickelt, um seltene Tumorzellen in menschlichem Blut quantitativ erfassen zu können. Hier bietet es die Möglichkeit der Detektion der applizierten MSCs zu verschiedenen Zeitpunkten im Blut. Die Zellen können außerdem auf Oberflächenmarker untersucht werden. Oberflächenmarker auf MSCs wie z.B. intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) und vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) spielen eine Rolle in Migration, Homing aber auch in der MSC vermittelten Immunsuppression.¹¹⁸ Die Veränderung der Oberflächenmarker *in vivo* im Blut sowie in den Organen, die mittels IHC untersucht werden können, ist ein wichtiger Untersuchungsgegenstand für das präklinische Tiermodell. Der Vergleich zwischen gesunden und kranken Tieren, denen MSCs injiziert wurden, kann wichtige Einblicke in die Unterscheidung von MSC-Subpopulationen geben. Zudem wurde bisher *in vivo* nicht gezeigt, ob die als Minimalkriterien der ISCT definierten Positivmarker (CD73, CD105, CD90) in den hMSCs weiterhin exprimiert werden oder sich deren Expression *in vivo* verändert. Das Wissen darüber kann wichtige Rückschlüsse für das Wiederfinden der hMSCs in der Humantherapie bringen, da die Zellen für die Applikation in den Menschen aus Sicherheitsgründen nicht markiert werden können.

1.2.1.5 MSC-Therapie Studien, in denen die PK untersucht wurde

In der MSC-Therapie hat der Paradigmenwechsel weg von einer Zellersatztherapie und hin zu trophisch unterstützenden Funktionen der MSCs auch einen Wechsel von der lokalen Anwendung zur systemischen Applikation nach sich gezogen. Die systemische Injektion der MSCs ist weniger invasiv und praktischer durchführbar, insbesondere für wiederholte Applikationen. Jedoch erreicht, wie auch bei der Knochenmarkstransplantation, nur ein geringer Prozentsatz der transplantierten Zellen (meist unter 1%) das Zielgewebe, da die Zellen in den Kapillaren der Leber, der Milz und insbesondere der Lunge gefangen (Trapping) werden.¹¹⁹ MSCs, die in der Lunge gefangen werden, werden zu Mikroembolien, die potentiell tödlich sein können.¹²⁰ Das Trapping findet nicht unerwartet statt, da MSCs an Plastik anheften und auch aneinander heften.¹²¹ Schrepfer¹²² konnte das Entrappment in der Lunge durch Vorbehandlung der Zellen mit Natrium-Nitroprussid vermindern; auch durch die

117 Pantel et al., 2008

118 Ren et al. 2011

119 Ankrum and Karp 2010

120 Lee et al. 2009

121 Colter et al. 2001; Friedenstein et al. 1968

122 Schrepfer et al. 2007

Benutzung eines Vasodilatators während der i.v. Applikation von MSCs in Ratten konnte die Zahl der in der Lunge verbleibenden Zellen reduziert werden. Dennoch blieb in beiden Fällen ein hoher Anteil an Zellen, die sich nach Applikation in der Lunge befanden. Die meisten Veröffentlichungen mit i.v. Applikation von MSCs zeigen das Entrapment in der Lunge¹²³ und dennoch ein positives therapeutisches Ergebnis, siehe Tab. 3: Literaturquellen zur Bioverteilung von mMSCs oder hMSCs in Mäusen. Auch in anderen Organen konnten die MSCs nach Applikation in ein Tiermodell zu einem weit geringeren Anteil innerhalb eines kurzen Zeitraums gefunden werden, z. B. für drei Tage in den Nieren¹²⁴ oder in der Milz¹²⁵, was die Theorie aufstellen ließ¹²⁶, dass die Milz eine weitere Barriere für MSCs auf dem Weg zu ihrem Zielorgan sein könnte. Auch eine geringe Verteilung von hMSCs (unter 1%) konnte (neben Niere und Milz) in Leber, Gehirn, Lunge, und Pankreas gefunden werden.¹²⁷ Es ist bei den Studien mit i.v. Applikation erst eine Anhäufung der MSCs in der Lunge zu beobachten und dann eine Clearance der Zellen.¹²⁸ MSCs, die sich noch in der Zirkulation befinden, könnten in Apoptose oder Anoikis gehen.¹²⁹ Toma¹³⁰ postulierte, dass MSCs in Präkapillaren Ischämien bewirken und deshalb ein Großteil der Zellen verschwindet. Dieser Theorie nach migrieren die überlebenden MSCs durch die Gefäßwand und befinden sich dann in der perivaskulären Nische, siehe Abbildung 7.

123 Lee et al. 2009

124 Rodriguez et al. 2012b

125 Jasmin et al. 2012; Barbash et al. 2003a

126 Barbash et al. 2003a

127 Lee et al. 2009

128 Henschler et al. 2008

129 Neubauer et al. 2012

130 Toma et al. 2009

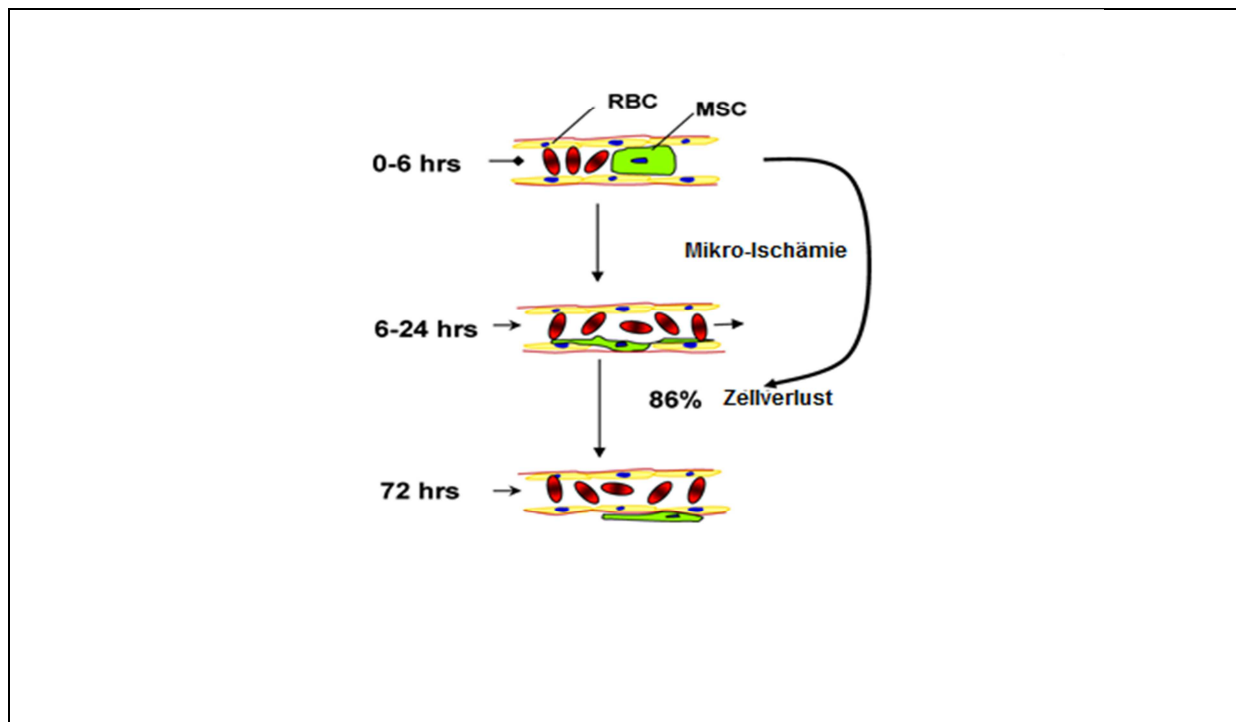


Abbildung 7: Hypothese des intravaskulären Schicksals kulturrexpanzierter MSCs.

Modifiziert nach Toma et al. 2009

Erläuterung zu Abbildung 7: Nach intraarterieller MSC Injektion tritt auf dem präkapillaren Bereich Obstruktion des Blutflusses auf. Die daraus resultierende Ischämie führt zu einem Verlust des Großteils der injizierten Zellen (86%). Die wenigen überlebenden Zellen breiten sich zunächst auf der luminalen Seite des Gefäßes aus und lokalisieren sich dann in der perivaskulären Nische.

Da die therapeutischen Effekte unabhängig von der Lokalisation der injizierten Zellen stattfinden, kurzlebig sind und den dynamischen Interaktionen zwischen MSCs und Wirtszellen unterliegen, wurde ein PK-Modell erstellt, das die therapeutische Aktivität von MSCs als Funktion ihrer Substanz-Auslieferung beschreibt. Hierin sind die MSCs als Substanz-beladene Partikel beschrieben.¹³¹ Im Zwei-Kompartiment-Modell erklärt sich die Diskrepanz zwischen theoretischer und tatsächlicher Bioverfügbarkeit der MSCs: Die Intravasation (K2) und die Rate der Clearance (Rc) sind signifikant höher als die theoretische Gewebs Extravasation (K1), was in einer viel kürzeren Halbwertszeit des zellulären Therapeutikums endet, siehe Abbildung 8.

131 Parekkadan and Milwid 2010

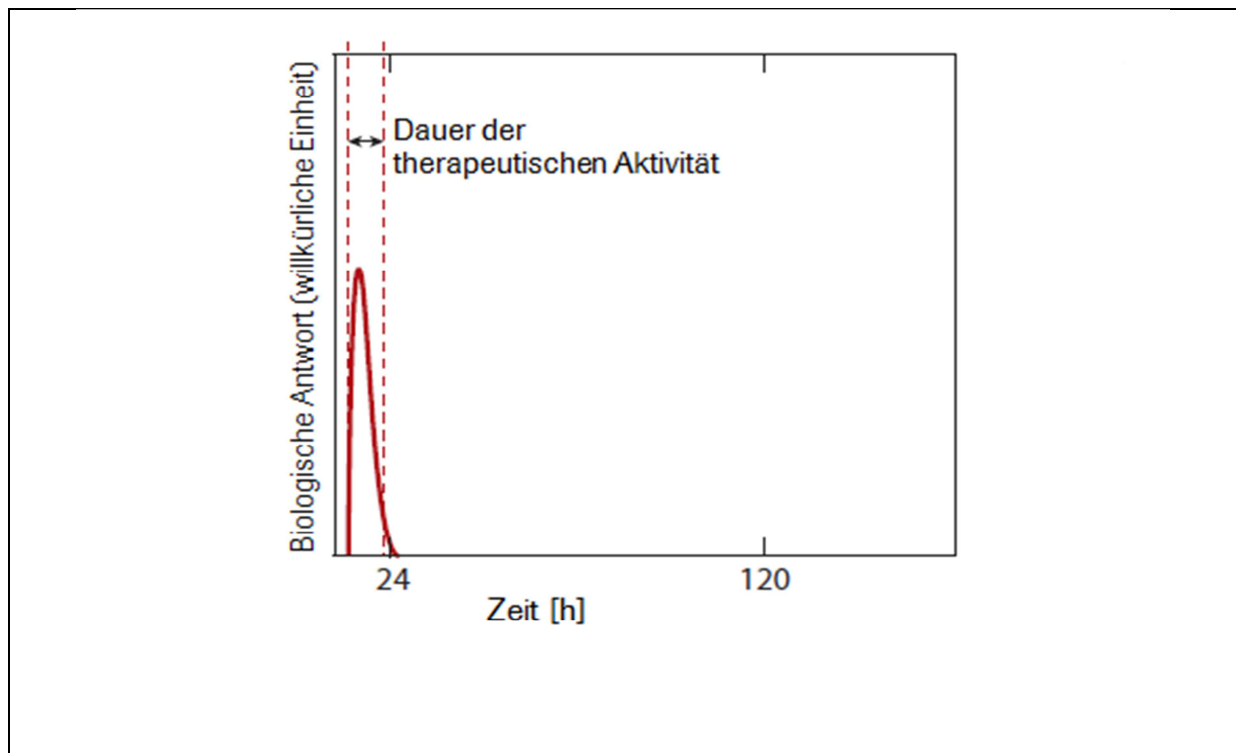


Abbildung 8: Therapeutische Aktivität in der MSC-Therapie. Modifiziert nach Parekkadan and Milwid 2010

Erläuterung zu Abbildung 8: Es wird ein Zwei-Kompartiment-Modell angenommen. Wird eine minimale Konzentration in der MSC Therapie gewählt und diese Zeitskala in eine biologische Antwort transponiert, wird ersichtlich, dass MSCs nur in einem schmalen therapeutischen Fenster aktiv sind, in weniger als 24 h. Diese Zeitskala stimmt mit gemessenen Serum Zytokin Leveln überein, die direkt mit der MSC Therapie verbunden sind.

Tab. 3: Literaturquellen zur Bioverteilung von mMSCs oder hMSCs in Mäusen

Studie	Krankheitsmodell	Mausmodell	Quelle der MSCs	Detektionsmethode	Applikationsmethode und applizierte Menge	Befunde
Aguilar et al. 2007	keins	NOD/SCID	hMSCs (KM und fötales Blut) und mMSCs (KM aus NOD/SCID)	Lentivirale eGFP Transfektion	2×10^6 i.v.	Woche 4: keine hMSCs detektierbar - Tumorknoten formende mMSCs in Lungen- Parenchym (Histologie)
Allers et al. 2004	keins	Nude Mäuse	hMSCs (KM)	PCR (humanes β -Globin Gen) In situ Hybridisierung, Technetium	$0.2-2 \times 10^5$ i.v.	nach 4-13 Monaten: hMSCs in KM und Milz detektierbar
Altman et al. 2009	Verletzung	Nude Mäuse	hMSCs (Fett)	Lentivirale GFP Transfektion	Ausgesät auf einem Seide Fibroin-Chitosan Gerüst, das in eine Haut-Wunde gelegt wurde	Nach 4 Wochen: hMSCs überlebten, förderten die Wundheilung und differenzierten in epidermale, epitheliale und fibrovaskuläre Zellen. Es konnte keine Migration beobachtet werden.
Anjos-Afonso et al. 2004	Sublethal bestrahlte syngene Mäuse	NOD/SCID und C57BL/6/J Mäuse	mMSCs, KM (syngen)	eGFP FACS, PCR (eGFP) und IHC	2×10^6 i.v.	In den ersten Tagen nach Injektion konnten die mMSCs gefunden werden in Lunge, Leber und Nieren. Ab Tag 7 bis Tag 28 außerdem noch in Muskel, Herz, Gehirn und Milz. In der Lunge wurden besonders viele mMSCs gefangen und es kam zu Embolien.
Bai et al. 2011	Myocardiales Infarkt Model	SCID Mäuse	hMSCs (Fett)	Lentiviral transduziertes GFP/Luciferase Fusions Gen	5×10^5 hMSCs wurden in die Peri-Infarkt Region 8–12 Wochen alter Mäuse injiziert	Tracking durch Luciferase-basierte BLI und GFP Fluoreszenz Woche 8: hMSCs überlebten im Infarkt-Myokard. 3.5% differenzierten in Kardiomyozyten und epitheliale Zellen.
Bentzon et al. 2005	keins	NOD/SCID Mäuse	immortalisierte humane MSC Linie (hMSC-TERT)	eGFP Transfektion Fluoreszenz, IHC, PCR	1×10^6 MSCs wurden i.v. oder in den linken Ventrikel appliziert	hMSC-TERT wurden nach systemischer Injektion unspezifisch in der Mikrovaskulatur gefangen. Die Überlebensrate der MSCs war niedrig. Nach 4 Wochen hatten nur wenige MSCs in Lunge, Herz und Nieren Glomeruli überlebt.

Furlani et al. 2009	keins	SCID Mäuse	hMSCs (KM)	eGFP Transfektion	Injiziert in die abdominale Aorta durch die linke femorale Arterie in 2 verschiedenen Konzentrationen: 1×10^6 oder 0.2×10^6 hMSCs	40 und 25% der Tiere starben an pulmonalen Embolien
Jang et al. 2010	Schlaganfall	4-6 Wochen alte männliche Nude Mäuse	mMSCs (KM)	Luciferase BLI wurde in lebenden Tieren gemessen	Stereotaktische Transplantation von 1×10^6 mMSCs in die Sham und die Infarkt Region der Mausmodelle. Zellverteilung und Signalintensität der BLI wurden gemessen.	Woche 4: die transplantierten mMSCs migrierten in die Infarkt-Grenzregion
Jasmin et al. 2012	Chagas Krankheit	Adulte männliche CD1 Mäuse	mMSCs aus KM	X-Sight 761-markierte mMSCs detektiert durch Confocale Mikroskopie Sowie Kleintier Positronen Emissions Tomographie (microPET)	3×10^6 MSCs i.v. einen Monat nach Chagas Infektion	Kontrolltiere: mMSCs konnten in Leber, Lunge und Milz gefunden werden, in den infizierten Mäusen außerdem einige mMSCs im Herzen. Durch das miroPET konnte gezeigt werden, dass die MSC Therapie die rechte ventrikuläre Dilatation (hervorgerufen durch die Chagas-Krankheit) reduzierte.
Kidd et al. 2009	Wunde	Balb/c oder SCID/CB	hMSCs (KM) und mMSCs aus Balb/c KM	Luciferase	1×10^6 MSCs i.v. oder i.p.	Kontrollmäuse ohne Wunde: hMSCs waren in SCID Mäusen bis Tag 10 nachweisbar. Tag 1-4 in der Lunge, ab Tag 5 in Leber und Milz. Die Verteilung (zuerst Lunge, später Leber und Milz) fand sich auch in den Balb/c Mäusen, nur verschwanden die mMSCs schneller aus der Lunge (Peak nach 1,5 h – keine Detektion mehr nach 18h)

						Bei verwundeten Mäusen zeigte sich eine hMSC Verteilung wie bei den Kontrollmäusen und zusätzlich gab es ab 3 Tagen nach Transplantation auch ein BLI Signal an der Stelle der genähten Inzision.
Lalande et al. 2011	Knochenbruch	Nude Mäuse	hMSCs (Fett)	Labeling mit USPIO, detektiert durch MRT, FACS, Mikroskopie, Transmissionselektronenmikroskop (TEM)	$5 \times 10^4 \times$ oder 5×10^5 hMSCs wurden auf einem porösen, Polysaccharid.basierten Gerüst ausgesät. Dieses wurde subkutan in den Rücken transplantiert, auf einer Seite mit markierten hMSCs, auf der anderen Seite nicht nicht markierten hMSCs.	Woche 4: hMSCs blieben detektierbar und waren um die Fläche des Transplantats migriert. .
Lee et al. 2009	Myokardinfarkt	NOD/SCID	hMSCs (KM)	Humanspezifische Alu-repeats RT-PCR Microarray mRNA Assay Mikroskopisch Herz	2×10^6 hMSCs i.v.	Die Mehrheit der i.v. applizierten Zellen wurde in der Lunge gefangen als Emboli mit einer HWZ von 24h. Eine geringe Verteilung von hMSCs (unter 1%) fand sich in Leber, Gehirn, Lunge, Niere, Milz und Pankreas. Die hMSCs konnten durch parakrine Effekte, wie durch TSG-6 ¹³² , die Größe des Myokardinfarkts verringern.
Levi et al. 2010	Defekte im Schädeldach	Nude Mäuse	hMSCs (Fett)	GFP markierte hMSCs, Histologie, Histomorphometrie und FISH auf humane Sex Chromosomen, PCR (humanes GAPDH)	1.5×10^5 hMSCs ausgesät auf einem Polylactid-co-Glycolid (PLGA) Gerüst aufgetragen	Woche 4: hMSCs waren in der Lage kritisch große calvariale Defekte zu ossifizieren. Die hMSCs nahmen graduell ab, in Woche 4 waren keine hMSCs mehr durch FISH detektierbar.

132 TSG6 ist Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein

Meyerrose et al. 2007	Bestrahlung	1) NOD/SCID 2)nude/NOD/SCI D 3) NOD/SCID/MPS VII	hMSCs (Fett)	Retroviral transfiziertes GFP	10^6 hMSCs i.v., i.p. oder subcutan (s.c.) in sublethal bestrahlte Mäuse	Tage 35, 45, 60 und 70: hMSCs konnten in Darm, Leber, Lunge, Nieren. Muskel, Gehirn und Fett detektiert werden mit abnehmender Anzahl über die Zeit.
Mouiseddine et al. 2012	Bestrahlung des Abdomens	NOD/SCID	hMSCs(KM)	Histologie, TdT- mediated dUTP- biotin nick end labeling (Tunel Assay), PCR (humanes β - Globulin Gen), Serum Lebermarker	5×10^6 hMSCs, i.v.	5 Tage nach Behandlung: hMSCs konnten durch PCR in Dünndarm ($0.2\% \pm 0.03$) aber nicht in der Leber oder den Nieren gefunden werden. Die hMSC Therapie hatte dennoch einen positiven Effekt auf die Lebermarker.
Vilalta et al. 2008	Keins	Nude Mäuse	hMSCs (Fett)	Lentiviral transfiziertes GFP/Luciferase Fusions Gen	5×10^5 hMSCs i.m. oder i.v.	Nach 8 Monaten: 75% der i.m. applizierten hMSCs blieben an der Injektionsstelle. Die i.v. applizierten Zellen konnten für eine Woche in der Lunge wiedergefunden werden, danach waren sie aus der Lunge geclart worden. 32 Wochen lang konnten einzelne hMSCs in der Leber detektiert werden.

1.3 Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus (DM) wächst im 21. Jahrhundert in entwickelten und in nicht entwickelten Ländern zu einer der größten Gefahren für die menschliche Gesundheit heran¹³³, was ihn zu einer bedeutenden möglichen Anwendung für die MSC-Therapie macht. Bevor die MSC-Therapie zum klinischen Einsatz kommen kann, ist u.a. die PK in verschiedenen Krankheitsmodellen zu untersuchen. Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Vergleich der Bioverteilungen von i.v. injizierten hMSCs in ein Wildtyp Mausmodell einerseits und in ein DM Mausmodell andererseits erstellt werden.

Um den Unterschied der Bioverteilungen in den beiden verwendeten Mausmodellen zu verstehen, ist das Verständnis für Pathogenese und klinische Ausprägung des DM von Bedeutung: Insulinproduzierende β -Zellen sind in den Langerhansinseln, dem endokrinen Kompartiment des Pankreas, lokalisiert. Sie tragen zu ca. 1-2% der Organmasse des Pankreas bei und sind verantwortlich für die Glukose Homöostase. Es befinden sich ca. 2000 Langerhansinseln in einem menschlichen Pankreas, wobei ca. 80% der durchschnittlich 2000 Zellen β -Zellen sind.¹³⁴ DM ist eine chronische Krankheit, die charakterisiert ist durch den Verlust an β -Zellmasse in den Langerhansinseln sowie durch einen Zerfall der Glukose Homöostase, was zu einer Vielzahl an schwerwiegenden Komplikationen und zu einer generell verkürzten Lebenserwartung führt.¹³⁵ Ein dauerhaft erhöhter Blutglukosespiegel kann Langzeitkomplikationen zur Folge haben, insbesondere kardiovaskuläre Erkrankungen und Schäden an den kleinen Blutgefäßen und Nerven wie Nephropathien, Retinopathien und Neuropathien.¹³⁶ Hauptsächlich nach später Diagnose bzw. aufgrund von Schwierigkeiten, die angemessene Behandlung zur Blutglukosekontrolle bereitzustellen, kann es zu diesen ernsthaften Spätfolgen kommen.

Frederick Banting und John Mcleod entdeckten zwischen 1921 und 1922 das Insulin, wofür sie 1923 den Nobelpreis erhielten: Die Entdeckung von Insulin und die Benutzung seiner synthetischen Formen änderte den klinischen Verlauf des DM von einer akut tödlichen Krankheit hin zu einer chronischen Krankheit mit schwerwiegenden Langzeit-

133 Fazeli Farsani et al. 2013

134 Madsen and Kaestner 2004

135 Gonez and Knight 2010

136 Aguayo-Mazzucato and Bonner-Weir 2010

Komplikationen. Es wurde schon früh klar, dass das Spritzen des Hormons Insulin nicht komplett die β -Zellen des Pankreas ersetzen kann und keine Heilung des DM bedeutet.¹³⁷ Seither wurde in der Entwicklung lang- und kurzfristig wirkender Insulin-Behandlungen mit Heim-Glukosemessgeräten, durchgängig messenden Glukose-Sensoren und Insulinpumpen ein erheblicher Fortschritt gemacht. Trotz dieser Fortschritte bleibt die engmaschige Glukosekontrolle, die eine kontinuierliche Aufmerksamkeit auf Blutglukosewerte und Kohlenhydrataufnahme erfordert, unausweichlich.¹³⁸ Hinzu kommt, dass derzeit erhältliche Therapien nur symptomatisch sind und entweder die Insulin-Resistenz¹³⁹ oder den Insulin-Mangel durch Insulintherapie¹⁴⁰ behandeln.¹⁴¹ Auch wenn die Insulin-Therapie lebenserhaltend ist, verändert sie nicht das Fortschreiten der Krankheit DM. Sogar unter intensiver Insulin-Therapie mit optimierter glykämischer Kontrolle zeigt ein 24 h Glukose-Profil bei Patienten variable hypoglykämische und hyperglykämische Zeitintervalle, die sich mit euglykämischen Intervallen abwechseln. Euglykämische Intervalle decken lediglich ca. 65% des Tages ab,¹⁴² was zu schwerwiegenden kardiovaskulären und psychologischen Effekten führen kann.¹⁴³ Moderne Insulintherapien sind demnach unzureichend, um Euglykämie auf einer täglichen Basis zu gewährleisten.¹⁴⁴ Sie verhindern nicht die Langzeitkomplikationen, insbesondere kardiovaskuläre Erkrankungen und Schäden an den kleinen Blutgefäßen und Nerven, die mit einem erhöhten Blutglukosespiegel einhergehen.¹⁴⁵ Daher ist ein wichtiges Ziel in der Behandlung des T1D und seiner zugehörigen Komplikationen, die übrige Betazellmasse zu erhalten.¹⁴⁶

Die weltweite Anzahl an Patienten, die an Typ 1 DM (T1D) oder an Typ 2 DM (T2D) erkrankt sind, lag 2011 bei 366 Millionen und wird sich voraussichtlich im Jahr 2030 auf über 552 Millionen Fälle erhöht haben, deren Ursache ein dramatischer Anstieg insbesondere der T2D Neuerkrankungen ist.¹⁴⁷ DM ist die Hauptursache für Blindheit und Nierenleiden im Erwachsenenalter und erhöht, vor allem durch kardiovaskuläre Erkrankungen, das Risiko frühzeitig zu versterben. Die Krankheit bedeutet durch ihre Handhabung, ihre

137 Azzi et al. 2010; Furth and Atala 2009

138 Hamad et al. 2012

139 Insulin-Resistent tritt bei DM Typ 2 (T2D) auf.

140 Eine Insulin-Therapie ist bei allen insulinpflichtigen Patienten erforderlich, das sind alle Patienten mit DM Typ 1 (T1D) und ein Drittel der Patienten mit T2D.

141 Furuta et al. 2010; Inzucchi 2002; Wen et al. 2011; Bhansali et al. 2009; Gonez and Knight 2010

142 Bode et al. 2005

143 Bhansali et al. 2009

144 Bode et al. 2005

145 Aguayo-Mazzucato and Bonner-Weir 2010

146 Steele et al. 2004

147 Schroeder 2012

Komplikationen und die Langzeitschäden eine enorme Belastung für die Patienten und deren Familien sowie für das Gesundheitswesen.¹⁴⁸

Ein DM wird diagnostiziert, wenn mindesten zwei der folgenden Kriterien erfüllt sind:

- 1) Klassische Symptome (Polyurie, Durst, Gewichtsverlust, Abgeschlagenheit) in Verbindung mit einer Blutglukosekonzentration von über 200 mg/ml
- 2) Blutglukosewerte über 200 mg/dl an zwei verschiedenen Messungen
- 3) Zwei Messungen der Nüchternblutglukose von über 126 mg/dl sowie ein Blutglukosewert von über 200 mg/dl im 2 h Wert des Glukosetoleranztests.¹⁴⁹

1.3.1.1 Diabetes mellitus Typ 1 und Typ 2

Man unterscheidet also zwischen den verschiedenen DM Typen, die wie folgt spezifiziert werden:

Diabetes mellitus Typ 1 (T1D), auch juveniler Diabetes genannt, resultiert aus einem zellvermittelten Autoimmunangriff auf die β -Zellen in den Langerhans Inseln des endokrinen Pankreas.¹⁵⁰ T1D ist die häufigste Autoimmunerkrankung der frühen Kindheit, die klassischer Weise Kinder von 0 bis 7 Jahren betrifft.¹⁵¹ Die Krankheit kann jedoch auch noch später im Erwachsenenalter einsetzen.¹⁵² Ihre Inzidenz steigt weltweit in jeder Altersklasse¹⁵³, zwischen 1990 und 1999 um 2,8% pro Jahr und macht mittlerweile 10% aller Diabetes Neuerkrankungen im Erwachsenenalter aus.¹⁵⁴ Weltweit leiden schätzungsweise 200 Millionen Menschen an T1D; eine Zahl, die sich bis 2030 laut Schätzungen verdoppeln dürfte.¹⁵⁵ Die Entwicklung von T1D hängt u. a. von einer genetischen Disposition ab; es bedarf zusätzlich anderer Auslöser, z. B. virale Trigger wie Mumps-, Röteln-, Influenza-, Zytomegalie-, Varizella-, Poliomyelitis- und Hepatitis A Viren, sowie andere Umwelteinflüsse wie Kuhmilchproteine, Nitrosamine und psychosoziale Faktoren¹⁵⁶, die bisher nicht

¹⁴⁸ Gonez and Knight 2010

¹⁴⁹ Kiess et al. 2001

¹⁵⁰ Gepts 1965; Kiess et al. 2001

¹⁵¹ In Nordamerika werden jedes Jahr 13000 Neuerkrankungen diagnostiziert, was T1D zu einer der häufigsten Krankheiten in dieser Altersgruppe der Kinder macht (Azzi et al. 2010).

¹⁵² Fandrich and Ungefroren 2010

¹⁵³ Azzi et al. 2010; Gonez and Knight 2010

¹⁵⁴ Gonez and Knight 2010

¹⁵⁵ Wild et al. 2004

¹⁵⁶ Kiess et al. 2001

vollständig verstanden werden, um den Diabetes Ausbruch (Onset) einzuleiten.¹⁵⁷ In der Selbst- und Fremderkennung gestörte T-Lymphozyten vom Helfertyp 1 (Th1-Zellen) sezernieren inflammatorische Zytokine wie IL-1b, IFN- γ und TNF- α , die in den β -Zellen proapoptotische Signalwege einleiten.¹⁵⁸ T1D betrifft 30-40% der genetisch prädispositionierten Individuen. Als Folge dieser Th1-vermittelten Autoimmunprozesse werden die β -Zellen des Pankreas graduell, bis hin zum völligen Insulin Ausfall, vernichtet.¹⁵⁹ Insulin Mangel führt zu einem potentiell lebensbedrohlichen Anstieg der Blutglukose, der langfristig Schäden an Blutgefäßen und Nerven nach sich zieht.¹⁶⁰ Pankreatische Autoantigene scheinen eine wichtige Rolle im Fortschreiten der autoimmunen Inselzerstörung zu spielen¹⁶¹. Die Autoantikörper sind wahrscheinlich nicht am Beginn der β -Zell-Zerstörung beteiligt aber repräsentieren ein Sekundärphänomen, da sie nach der Initial-Beschädigung des Pankreas freigesetzt werden.¹⁶²

Diabetes mellitus Typ 2 (T2D) ist eine heterogene und multifaktorielle Krankheit, charakterisiert durch eine Hyperglykämie, die durch progressive β -Zell Dysfunktion und eine vorhergehende, langfristige Insulinresistenz ausgelöst wurde¹⁶³. Bei Diagnosestellung des T2D sind meist schon über 50% der β -Zellmasse verloren, die sich mit zunehmendem Fortschreiten der Krankheit und anhaltender Insulinresistenz weiterhin verringert.¹⁶⁴ Die Hyperglykämie ist verbunden mit einem funktionellen Insulinmangel, genauer mit einer reduzierten Insulinsekretion aus den Inseln, einer abnehmenden Antwort der Zielorgane oder einer gesteigerten Aktivität gegenregulierender Hormone¹⁶⁵ wie z. B. Glucagon.¹⁶⁶ T2D betrifft in den meisten Fällen übergewichtige Patienten im letzten Lebensdrittel.¹⁶⁷ Der Schweregrad der klinischen Manifestation des T2D ist direkt verbunden mit dem Vorhandensein und der Funktionalität der Inselhormone.¹⁶⁸

157 Dominguez-Bendala et al. 2012

158 Kiess et al. 2001

159 Fandrich and Ungefroren 2010; Bhansali et al. 2009

160 Gonez and Knight 2010

161 v. a. betrifft das Autoantikörper gegen Glutamat-Decarboxylase (GAD), Insulin, Insulinom-assoziiertes Protein 2 und Zink Transporter 8 (Groop and Pociot 2013)

162 Groop and Pociot 2013

163 T2D entwickelt sich wenn die β -Zellen des Pankreas den erhöhten Insulinbedarf aufgrund von Insulinresistenz und Übergewicht nicht mehr auffangen können (Groop and Pociot 2013).

164 Bhansali et al. 2009; McAuliffe and Christein 2013

165 Diese Insulin-gegenregulierenden Hormone können bei Überaktivität Hyperglykämie auch im Fastenzustand auslösen.

166 McAuliffe and Christein 2013

167 Kiess et al. 2001

168 McAuliffe and Christein 2013

1.3.1.2 Diabetes mellitus Mischformen

Das Spektrum diabetischer Krankheiten umfasst mehr als T1D und T2D. Es ist wahrscheinlich, dass diese beiden Formen die Extreme sind in einem Kontinuum der Autoimmunität, Insulin-Mangel und T1D auf der einen Seite sowie dysfunktionalem Stoffwechsel, metabolischem Syndrom und T2D auf der anderen Seite. Diabetes ist eine fortschreitende Krankheit: T2D Patienten entwickeln nach über 20 Jahren der Krankheit häufig verschlechterte Insulinsekretion mit einem T1D-ähnlichen Phänotyp und es ist möglich, dass T1D Patienten nach langanhaltender Krankheit Anzeichen eines metabolischen Syndroms entwickeln.¹⁶⁹

Zu den Mischformen des DM gehören folgende zwei Formen:

LADA (Latent Autoimmune Diabetes in Adults) ist eine Subgruppe des Diabetes, an der ca. 7% aller diabetischen Patienten in Europa erkrankt sind. LADA wird definiert als ein Glutamat-Decarboxylase (GAD) -Autoantikörper positiver Diabetes, der bei Patienten über 35 Jahren auftritt.¹⁷⁰

MODY (Maturity-Onset-Diabetes of the Young) repräsentiert monogene Formen des Diabetes mit gut definierten Mutationen in sechs verschiedenen Genen, wobei mit dem Fortschritt in der Forschung die Zahl gefundener Gene stetig wächst. Die Krankheit wird charakterisiert durch autosomal dominante Übermittlung des early-Onset Diabetes (unter 25 Jahren) und variablem Grad an Betazell-Dysfunktion.¹⁷¹

In Abbildung 9 ist die Betazellmasse und der Zusammenhang untereinander von verschiedenen Diabetesformen beschrieben.

¹⁶⁹ Groop and Pociot 2013; Thorn et al. 2005

¹⁷⁰ Groop and Pociot 2013

¹⁷¹ Groop and Pociot 2013; Tattersall 1974

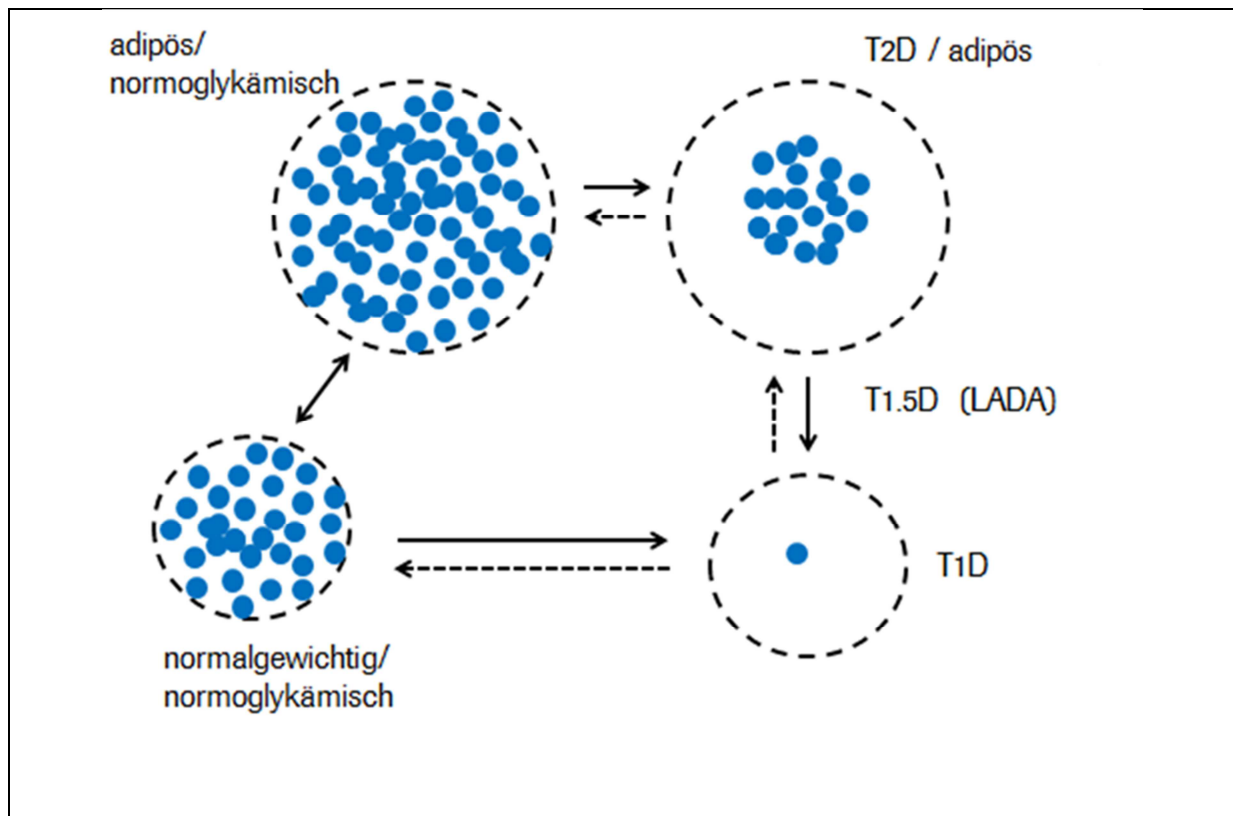


Abbildung 9: Betazellmasse in den verschiedenen DM Typen, modifiziert nach Madsen 2005; Madsen and Kaestner 2004

Erläuterung zur Abbildung 9: Der gemeinsame Nenner aller Diabetesformen ist die nicht ausreichende Betazellmasse. Die durchschnittliche Inselgröße eines gesunden Erwachsenen ist unten links eingezeichnet. Autoimmun-vermittelte, aggressive Betazellzerstörung führt zu T1D, unten rechts. Ein erhöhter Insulinbedarf wird durch eine vergrößerte Betazellmasse gedeckt, oben links. Auf Dauer scheitert die erhöhte Insulinproduktion, da die Betazellen den erhöhten Anforderungen nicht genügen können und sterben. Dies führt zu T2D, oben rechts. Ein Teil der T2D Patienten erlebt einen weiteren Betazellabbau (teilweise autoimmun, T1.5D) und wird ebenfalls insulinpflichtig. Die gestrichelten Pfeile stehen für Therapien, bzw. Therapieoptionen in der Zukunft, wie die Stammzelltherapie.

1.3.1.3 DM im Tiermodell

Im Rahmen dieser Arbeit wurde als das T1D Mausmodell folgendes Modell gewählt:

1.3.1.4 T1D Mausmodell: Nonobese Diabetic (NOD) Maus

NOD Mäuse sind ein Tiermodell für juvenilen Diabetes. Diese Mäuse entwickeln spontan einen T-Zell basierten DM und teilen viele der klassischen Merkmale des T1D beim

Menschen. Zu diesen Merkmalen gehören das Vorhandensein von Lymphozyten Infiltrationen in den Inseln des Pankreas vor dem Beginn des klinischen Diabetes, Insulinopenie, Hyperglykämie, Polyurie und Gewichtsverlust.¹⁷² Unbehandelt entwickeln diese Mäuse ebenfalls eine Ketose und sterben nach einigen Wochen des klinischen Diabetes. Anders als im Menschen wird im NOD Mausstamm eine geschlechtsspezifische erhöhte Inzidenz an Diabetes bei Weibchen beobachtet. Umweltfaktoren spielen bei der Inzidenz sowie dem Beginn des Diabetes eine Rolle.¹⁷³ Die Ähnlichkeiten mit dem T-Zell-basierten menschlichen Diabetes machen diese Mäuse für die Typ 1 Diabetes Forschung seit über 30 Jahren zu einem wichtigen Forschungsobjekt.¹⁷⁴ Die spontane Diabetesrate bei NOD Weibchen schwankt zwischen 60% und 80%,¹⁷⁵ und kann in verschiedenen Versuchstiereinrichtungen erheblich variieren.¹⁷⁶ Der spontane Diabetes Onset braucht, je nach Haltungsbedingungen, in NOD Mäusen die relativ lange Zeitspanne von der Geburt bis zur ca. 20. – 50. Lebenswoche. Dies kann durch die Gabe des alkylierenden Agens Cyclophosphamid beschleunigt werden, so dass diese NOD Mäuse bereits ca. 30 – 50 Tage nach Applikation einen spontanen DM entwickeln.¹⁷⁷ Der beschleunigte Krankheitsbeginn nach Cyclophosphamid-Gabe ist nach Brode¹⁷⁸ auf die Abnahme regulatorischer T-Zellen zurückzuführen.

1.3.1.5 T2D Mausmodelle

Um einen T2D abzubilden, wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei verschiedene Dosierungen von Streptozotocin (STZ) im Balb/c Mausmodell untersucht:

Diabetes mellitus Typ 2 kann in Mäusen durch niedrigdosierte Gaben des β -Zell Toxins STZ induziert werden. Während eine hochdosierte STZ-Behandlung durch eine fast vollständige Zerstörung der β -Zell-Inseln einen Diabetes Typ 1-ähnlichen Diabetes auslöst, wird durch eine niedrige Dosierung des Zellgiftes ein partieller β -Zell-Verlust induziert, der den späteren Stadien des T2D ähnelt.¹⁷⁹ Zusätzlich zur STZ-Gabe kann eine besonders fetthaltige Diät

¹⁷² Makino et al. 1980

¹⁷³ Leiter et al. 1990

¹⁷⁴ Karounos and Goes 2003; Liu et al. 2004

¹⁷⁵ Anderson and Bluestone 2005

¹⁷⁶ Karounos and Goes 2003

¹⁷⁷ Karounos and Goes 2003

¹⁷⁸ Brode et al. 2006

¹⁷⁹ Baribault 2010; Leiter et al. 1990; Nakamura et al. 2006

gegeben werden, da damit nicht nur der partielle β -Zell-Verlust eines T2D entsteht, sondern zusätzlich die in menschlichen Patienten mit T2D typische Insulinresistenz.¹⁸⁰

1.3.1.6 DM Therapien

Eine Heilung des T1D wird entweder Ersatz für Insulin-produzierende Zellen bereitstellen oder deren Regeneration fördern und wird in Kombination mit Behandlungen erfolgen, die die immunvermittelte Zerstörung der Betazellen verhindern.¹⁸¹ Die Transplantation ganzer humaner Pankreata oder isolierter Pankreasinseln aus Organspendern hat Patienten mit T1D Insulin-unabhängig gemacht und damit den Nachweis der Machbarkeit für Betazell-Ersatz Therapien erbracht¹⁸². Jedoch verringert sich die Transplantat Funktion schrittweise, nach 5 Jahren sind nur noch 10-15% der Patienten unabhängig von einer Insulinbehandlung. Der große Nachteil moderner Inseltransplantationen ist der Verlust der funktionellen Inseln während der frühen Phase nach der Transplantation, der schädliche Effekte auf das Ergebnis individueller Transplantate hat.¹⁸³ Der Mangel an Spendergewebe, ganzen Pankreata oder pankreatischen Inseln zieht eine Suche nach alternativen Zellquellen und der Verbesserung der Transplantationsprotokolle nach sich.¹⁸⁴

1.3.1.7 DM und MSC

Eine Alternative zu herkömmlichen Therapien könnte in Zukunft die adulte Stammzellforschung bieten.¹⁸⁵ MSCs haben die Fähigkeit, alloimmune und autoimmune Antworten zu unterdrücken, was sie als potentielle nicht-Antigen-basierte Immunotherapie wertvoll macht.¹⁸⁶ Therapieformen mit MSCs könnten einerseits die Transplantation von MSCs sein, die durch trophische und immunmodulatorische Effekte das Pankreasmillieu zugunsten der Betazellerhaltung verändern, oder sie könnten andererseits in Kombination mit Inselzellen transplantiert werden, um zusätzlich zu ihren positiven, therapeutischen Effekten die allogene Abstoßung der Inselzellen zu mindern,¹⁸⁷ und durch die Inhibition pro-

180 Luo et al. 1998

181 Gonez and Knight 2010

182 Aguayo-Mazzucato and Bonner-Weir 2010

183 Rackham et al. 2011

184 Aguayo-Mazzucato and Bonner-Weir 2010

185 Fandrich and Ungefroren 2010

186 Madec et al. 2009

187 Gabr et al. 2013

inflammatorischer Zytokine die Entzündungs-vermittelte Dysfunktion von Inseltransplantaten aufheben.¹⁸⁸

Die Transplantation von MSCs in Tiermodellen für Typ 1 Diabetes zur Geweberegeneration des Pankreas wurde publiziert¹⁸⁹, deren Ergebnisse teilweise widersprüchliche sind¹⁹⁰, z. B. konnte die einmalige Transplantation von MSCs nach Urban¹⁹¹ die Hyperglykämie Streptozotizin (STZ)-diabetischer C57Bl/6 Mäuse nicht beheben, wie das in anderen Publikationen bereits beschrieben wurde.¹⁹² Die meisten Veröffentlichungen weisen jedoch einen positiven Effekt für das diabetische Tier nach, siehe Tab. 4. Dieser Effekt entsteht nicht durch die *in vivo* Differenzierung der Stammzellen in β -Zellen des Pankreas sondern durch eine Erhöhung der Neovaskularisierung im Pankreas¹⁹³ sowie durch immunsuppressive Effekte, die entweder durch regulatorische T-Zellen¹⁹⁴ oder die Inhibierung der Infiltration durch Makrophagen und β -Zell-spezifische T-Zellen initiiert werden¹⁹⁵.

Die migratorische Aktivität von hMSCs *in vitro* Richtung VEGF-C lässt auf die Fähigkeit von MSCs schließen, auch *in vivo* in Richtung der Lymphknoten zu homen.¹⁹⁶ Tatsächlich wurde ein Homing der MSCs nach Applikation in diabetische Mäuse in die pankreatischen Lymphknoten beschrieben¹⁹⁷, was eine Interaktion mit aktivierten T-Zellen wahrscheinlich macht. Diabetogene T-Zellen entstehen in Lymphknoten, in denen sie mit Antigenen dendritischer Zellen in Kontakt kommen. MSCs könnten autoreaktive T-Zellen *in vivo* innerhalb der pankreatischen Umgebung direkt unterdrücken¹⁹⁸, was einen weiteren Teil ihrer Wirksamkeit in T1D Modellen erklären könnte.

Tab. 4: MSC-basierte Zelltherapie in experimentellen Tiermodellen von DM,
modifiziert nach Liu and Han 2008; Mabet and Shahin 2012

Referenz	MSC Quelle	Tiermodell	Ergebnis
Banerjee et al. 2005	Diabetische KM MSCs	STZ-diabetische Mäuse	Normoglykämie
Bell et al. 2012	hMSCs aus KM, ALDH-aktive Zellen	STZ-diabetische NOD/SCID Mäuse	Reduzierte Hyperglykämie Erhöhte Gesamt-Betazellmasse

¹⁸⁸ Yeung et al. 2012

¹⁸⁹ Fandrich and Ungefroren 2010; Pistoia and Raffaghello 2010

¹⁹⁰ Anzalone et al. 2011; Huss et al. 2005; Urban et al. 2008

¹⁹¹ Urban et al. 2008

¹⁹² Hess et al. 2003

¹⁹³ Huss et al. 2005

¹⁹⁴ Madec et al. 2009

¹⁹⁵ Urban et al. 2008

¹⁹⁶ Conrad et al. 2009

¹⁹⁷ Fiorina et al. 2009; Madec et al. 2009

¹⁹⁸ Zanone et al. 2010

	angereichert		Revaskularisierung der Inseln verminderte Blutglukose Inselähnliche Anhäufungen in der Leber.
Chao et al. 2008	hMSCs aus UC, die in Insulin-sekretierende Zellen induziert wurden	STZ-diabetische Mäuse	Einige fusionierte Leberzellen, die durch humanes Insulin und humane Kerne charakterisiert wurden, zeigten sekretorische Granula.
Chen et al. 2004 Wu et al. 2007	Insel-ähnliche Zellen, differenziert aus MSCs aus dem KM von Ratten hMSCs	STZ-diabetische Ratten	Niedrigere Glukose Level
Chi et al. 2008	Nabelschnurblut (UCB), die in Insulin-sekretierende Zellen induziert wurden	STZ-diabetische Mäuse	verminderte Blutglukose
Dong et al. 2008	Diabetische KM MSCs	STZ-diabetische Ratten	Initiierung pankreatischer Regeneration, Normoglykämie
Ende et al. 2004	hMSCs aus Nabelschnurblut (UCB) hMSCs aus dem KM von gesunden und von diabetischen Probanden, in Insulin-sekretierende Zellen induziert.	STZ-diabetische Mäuse	Verminderung der Hyperglykämie Histologische Verbesserung der Insulitis
Gabr et al. 2013		STZ-diabetische Nude-Mäuse	hMSCs wurden unter die Nierenkapsel transplantiert Euglykämie für 3 Monate
Itakura et al. 2007	Allogene Ratten MSCs aus KM plus Inselzellen	STZ-diabetische Ratten	Donor-spezifische Immuntoleranz Normale Insulinlevel Normoglykämie Keine GvHD Verbesserung der Insel Transplantat Morphologie und Funktion
Ito et al. 2010	Lewis Ratten-Inseln plus MSCs aus KM	Lewis Ratten und NOD/Scid Mäuse	Keine DM mehr Gut erhaltene Insel Struktur Signifikant erhöhte Kapillaren pro Betazell-Ratio Langzeit-Aufhebung der Hyperglykämie Verändertes diabetogenes Zytokin-Profil
Jurewicz et al. 2010	mMSCs aus NOR Mäusen	NOD Mäuse	Verringerte T-Zell Häufigkeit in pankreatischen Lymphknoten, verringerte Häufigkeit Antigen-präsentierender Zellen, vermehrte Anzahl plasmazytoider dendritischer Zellen
Karnieli et al. 2007	hMSCs aus KM transfiziert mit Pdx1	NOD/Scid Mäuse	Reduktion der Hyperglykämie Reparatur pankreatischer Inseln und renaler Glomeruli
Lee et al. 2006	hMSCs aus KM	STZ-diabetische NOD/Scid Mäuse	Verringerte Hyperglykämie Höheres Maus Insulin in behandelten Mäusen Humanes Insulin konnte nicht detektiert werden
Madec et al. 2009	In Weibchen: mMSCs aus KM (bei	4 Wochen alte (prä-diabetische) NOD	10^5 - 10^6 mMSCs pro Maus verzögerte den Ausbruch von

	bestrahlten Männchen: plus T-Zellen aus gesunden oder aus diabetischen Mäusen)	Mäuse	Diabetes und verminderte die Inzidenz von DM in den NOD Mäusen. MSCs verhinderten die Betazell-Zerstörung durch Aktivierung regulatorischer T-Zellen.
Rackham et al. 2011	mMSCs aus Nieren von C57/B16 Mäusen plus murine Inselzellen	STZ-diabetische C57/B16 Mäuse	Geringere Blutglukose (für 1 Monat): 92% der Mäuse zeigten Normoglykämie (42% der Mäuse, denen nur Inselzellen transplantiert wurden zeigten Normoglykämie)
Solari et al. 2009	Allogene Ratten MSCs aus KM plus Inselzellen + Kurzzeit-Immunsuppression	STZ-diabetische Ratten	Langzeit-Überleben des Insel Transplantats Insulinexpression in den Transplantaten Normale Serum Insulin Level Normoglykämie
Tsai et al. 2012	hMSCs aus UC, die in Insulin-sekretierende Zellen induziert wurden Syngene oder allogene mMSCs aus dem KM plus unfraktionierte KM Zellen	STZ-diabetische Ratten	Reduzierte Hyperglykämie Insulinproduzierende, humane Zellen waren in der Leber lokaisiert
Urban et al. 2008		STZ-diabetische C57/B16 Mäuse	Nur bei Injektion von MSCs + KM Zellen: Schnelle Erholung der Blutglukose und der Serum-Insulin Level, parallel dazu pankreatische Geweberegeneration
Xu et al. 2007	hMSCs aus KM transfiziert mit dem humanen Insulingen	STZ-C57/B16 Mäuse	Verbesserung des Körpergewichts, der Blutglukose und der Serum-Insulin Level für bis zu 6 Wochen

Aldehyd Dehydrogenase (ALDH)

Die MSC-Therapie ist auch im Menschen mit DM mit positiven Ergebnissen angewandt worden¹⁹⁹, jedoch sind dies bisher nur einzelne Studien. Ob sich die hauptsächlich positiven Resultate der experimentellen DM Modelle auf den Menschen übertragen lassen, bleibt demnach abzuwarten.

1.4 Tracking von Zellen

Um, wie in dieser Arbeit, injizierte Zellen später im Tier wiederfinden zu können, muss eine geeignete Tracking Methode ausgesucht werden: Das *in vivo*-Tracking von in Säugetiere applizierten Zellen stellt eine Möglichkeit der molekularen Bildgebung dar, markierte Zellen über Raum und Zeit *in vivo* zu verfolgen.²⁰⁰ Besonders geeignet sind hierfür nicht-invasive Methoden, welche die Zellen über einen beliebigen Zeitraum zu bestimmten Zeitpunkten sichtbar machen können. Um den Aufenthaltsort der applizierten Zellen zu untersuchen,

¹⁹⁹ Bhansali et al. 2009; Esmatjes et al. 2010

²⁰⁰ Lo Celso et al. 2009; Grimm et al. 2007

müssen die Versuchstiere nicht getötet werden, und der Weg der Zellen kann im selben Tier zu unterschiedlichen Zeitpunkten nachvollzogen werden.²⁰¹ Es gibt eine Reihe von Untersuchungsmethoden, bei denen jeweils unterschiedliche Markierungen an den Zellen vorgenommen werden müssen, die jeweils mit Vorteilen und mit Nachteilen verbunden sind. Die Untersuchungsmethoden unterscheiden sich durch die Parameter Detektionslimit, Gewebepenetration, Toxizität sowie durch die Stabilität der Markierung in Bezug auf Zeitdauer der möglichen *in vivo* Untersuchung und auf die Übertragung der Markierung auf andere Zellen. Im Folgenden sind die zurzeit gängigsten Methoden der Markierung und des *in vivo*-Trackings aufgelistet und in Abbildung 11 sind Vor- und Nachteile ausgesuchter Methoden tabellarisch zusammengefasst.

1.4.1.1 Bildgebende Verfahren

Die bildgebenden Verfahren in der Medizin dienen dem Ziel, aus Messwerten Bilder zu erzeugen, diese zu medizinischen Bildern zu verarbeiten und zu analysieren, um die Diagnostik und Therapie zu verbessern. Zu diesen Verfahren zählen u.a. die Röntgendiagnostik, die Computertomographie, die Magnetresonanztomographie, die Positronenemissionstomographie und die Positronen-Emissionstomographie. Röntgenstrahlen entstehen, wenn Elektronen hoher Geschwindigkeit durch Aufprall auf Materie abgebremst werden, wie dies in einer Röntgenröhre bei Auftreffen der durch die Beschleunigungshochspannung beschleunigten Elektronen auf die Anode geschieht.²⁰² Beim Röntgenverfahren wird die Tatsache genutzt, dass Röntgenstrahlen beim Durchdringen z.B. eines Körpers von unterschiedlichen Geweben verschieden stark geschwächt werden, wobei die Schwächung (Absorption) des Röntgenstrahls durch das Gewebe für die Messung der Dichte von Strukturen genutzt werden kann.²⁰³ Den tomographischen Verfahren gemeinsam ist, dass mit ihnen Schnittbilder (Tomogramme) des Körpers gewonnen werden.²⁰⁴ Die Computertomographie ist eine Weiterentwicklung des Röntgens, bei denen ausgehend von den registrierten Schwächungswerten des Röntgenstrahls transversale Bildschnitte von Gewebe und Organen angefertigt werden, die überlagerungsfrei zu zwei- oder dreidimensionalen Bildern hoher Auflösung zusammengesetzt werden und somit entsprechende Darstellungen dieser Gewebe und Organe ermöglichen.²⁰⁵ Bei der

²⁰¹ Koenig et al. 2009

²⁰² Hiddemann and Reiter-Theil 2000:492-493

²⁰³ Wetzke and Happle: 2009:10

²⁰⁴ Hiddemann and Reiter-Theil 2000:490

²⁰⁵ Wetzke and Happle: 2009:10-11

Computertomographie liefern die unterschiedlichen Gewebedichten den Bildkontrast, so dass sich Knochen gut darstellen lassen, während bei Weichteilgeweben, die annähernd dieselbe Dichte haben, die Kontrastierung der Strukturen erst durch Verwendung eines Kontrastmittels ermöglicht wird.²⁰⁶ Im Gegensatz zur röntgenbasierten Computertomographie, die mit einer nicht unerheblichen Strahlenbelastung verbunden ist, beruht die Magnetresonanztomographie (MRT, Kernspintomographie), bei der Radiowellen²⁰⁷ eingesetzt werden, auf der magnetischen Kernspinresonanz als Folge der Wechselwirkung des Spins der Atomkerne im Körpergewebe mit äußeren Magnetfeldern.²⁰⁸ Anders als bei Verfahren z.B. der Röntgendiagnostik werden bei den Verfahren der Nuklearmedizin radioaktive Substanzen zur Bildgebung benutzt, mit denen vorrangig funktionelle Vorgänge von Organen (und nicht deren anatomische Morphologie) nach dem Tracer-Prinzip²⁰⁹ abgebildet werden.²¹⁰ Als technische Weiterentwicklung des Szintillationsdetektors beruht die Gammakamera auf einem Szintillationskristall, der die aus dem Körper austretende γ -Strahlung misst, die mit Hilfe eines Lichtverstärkers (Photomultiplier) verstärkt wird und ein elektrisches Signal erzeugt, das zeitlich hoch aufgelöst aufgezeichnet und für dynamische Untersuchungen (Sequenzszintigraphie) verwendet werden kann.²¹¹ Zu den Verfahren der Nuklearmedizin gehört die Einzelphotonen-Emissionstomographie (SPECT, Single Photon Emission Computed Tomography), bei der mehrere Gammakameras um den Patienten rotieren, die γ -Strahlung in unterschiedlichen Projektionen messen, aus denen mittels Rekonstruktion der Schnittbilder Schichtaufnahmen und dreidimensionale Bilder erzeugt werden können.²¹² Die Positronen-Emissionstomographie (PET) ist ein weiteres Verfahren der nuklearmedizinischen Bildgebung, das das Phänomen der Positronenvernichtung²¹³ nutzt, durch Verwendung eines Detektorrings auf den Entstehungsort der Vernichtungsstrahlung schließt und durch

206 Hiddemann and Reiter-Theil 2000:509

207 Radiowellen besitzen eine größere Wellenlänge und damit geringere Energie als die ebenfalls zum Spektrum elektromagnetischer Wellen gehörenden Mikrowellen, deren Wellenlängen im dm- bzw. mm-Bereich liegen (Stroppe 2005:353). Erheblich kürzere Wellenlängen λ bzw. höhere Energie haben Röntgenstrahlung ($\lambda < 10^{-8}$ m) und Gammastrahlung (Tipler 1994:1008). Mit einer Röntgenröhre erreicht man Wellenlängen λ von ungefähr 10^{-11} m (Stroppe 2005:354).

208. Bei den äußeren Magnetfeldern handelt es sich um ein starkes konstantes Magnetfeld und ein gleichzeitig überlagerndes wechselndes Feld elektromagnetischer Wellen im Megahertzbereich (Radiowellen). (Hiddemann and Reiter-Theil 2000:509-512).

209 Das Tracer-Prinzip besagt, dass die biochemischen Eigenschaften des Moleküls unverändert bleiben, wenn stabile Isotope in organischen Verbindungen durch entsprechende Radionuklide ersetzt werden (Wetzke and Happle 2009:16).

210 Wetzke and Happle 2009:16

211 Wetzke and Happle 2009:17 ; Hiddemann and Reiter-Theil 2000:521-523

212 Wetzke and Happle 2009:17; Hiddemann and Reiter-Theil 2000:523-524

213 Unter der beim β^+ -Zerfall entstehenden Vernichtungsstrahlung (Annihilation) wird der Prozess verstanden, bei dem ein Elektron (e^-) und ein Positron (e^+) in zwei (oder drei) Photonen zerstrahlt werden ($e^-e^+ \rightarrow \gamma\gamma$), Grupen 2008:277

Bildrekonstruktion dreidimensionale Aktivitätsmuster in hoher Auflösung (Schichtaufnahmen) erzeugen kann.²¹⁴ In den folgenden Abschnitten werden MRT, PET und SPECT noch etwas näher betrachtet. Anschließend wird das optische Imaging als weitere Methode behandelt.

1.4.1.2 Magnetresonanztomographie

Magnetresonanztomographie (MRT) ist eine weitere Standardmethode des klinischen Imagings und unlängst haben Verbesserungen seine Verbreitung auch im *in vivo*-Imaging von Kleintieren gefördert. MRT basiert auf der Tatsache, dass Protonen einer Probe, die einem magnetischen Feld einer Radiofrequenz ausgesetzt wird, Energie absorbieren und während des Relaxationsprozesses ein detektierbares Signal abgeben. Es wird also der Kernspin²¹⁵ von Molekülen in einem Magnetfeld ermittelt. Die Stärke des Signals ist eine Funktion der Anzahl an Protonen und kann dementsprechend zurückgerechnet werden.²¹⁶ Der Relaxationsprozess kann durch zwei fundamentale Konstanten beschrieben werden: T1 (longitudinale Relaxation, Spin-Gitter-Relaxationszeit), die gewebespezifisch ist und von der Größe der Gewebemoleküle und deren Umgebung abhängt, und T2 (transverse Relaxation, Spin-Spin-Relaxationszeit), die kurz bei dichten Gewebetypen und lang bei Gewebetypen ist, die viel Wasser enthalten.²¹⁷

Die Sensitivität dieser Methode ist gering und die Quantifizierung einer markierten Zellpopulation ist äußerst schwierig, aber das räumliche Auflösungsvermögen ist sehr hoch (im Bereich von μm) und die Möglichkeit zum dreidimensionalen anatomischen Imaging ist gegeben.²¹⁸ MRT wird insbesondere eingesetzt, um Tumore und morphologische Parameter zu untersuchen.²¹⁹

Es gibt zwei Kategorien von MRT Markern: T1 Marker und T2 Marker, wobei die T2 Marker gebräuchlicher sind. Gadolinium (Gd^{3+}) und Mangan Kontrastmittel werden als T1 Marker benutzt.²²⁰ T2 Kontrastmittel basieren auf Eisenoxid: Superparamagnetisches Eisenoxid (SPIO), ultra kleines Superparamagnetisches Eisenoxid (USPIO), Magnetodendrimere und

214 Wetzke and Happle 2009:17, Hiddemann and Reiter-Theil 2000:524-525

215 Der Kernspin kommt z.B. bei Wasserstoffprotonen vor. Er kennzeichnet den kreiselähnlichen Drehimpuls um die Achse, den Atome mit einer ungeraden Atomzahl haben. Als Folge des Kernspins induzieren die so bewegten Ladungen ein schwaches Magnetfeld und der Kernspin richtet sich in einem starken externen Magnetfeld in paralleler oder antiparalleler Richtung entlang den Feldlinien des externen Magnetfelds aus. (Wetzke and Happle 2009:12).

216 Dufort et al. 2010; Li et al. 2010

217 Hiddemann and Reiter-Theil 2000:513

218 Li et al. 2010

219 Dufort et al. 2010

220 Li et al. 2010

mikro-große Eisenoxid Partikel (MPIOs).²²¹ Diese magnetischen Marker werden in die (Stamm-)Zellen aufgenommen und können Langzeit-Gesundheitsrisiken bergen durch Endozytose magnetischer Partikel, insbesondere im Zentralnervensystem (ZNS). MRT kann benutzt werden, um markierte Zellen für mindestens 16 Wochen in beschädigtem Gewebe zu verfolgen und es konnte sogar gezeigt werden, wohin die Zellen emigrierten.²²²

Aber auch wenn MRT eine vielversprechende *in vivo*-Tracking Methode für MSCs darstellt, so gibt es auch einige Einschränkungen in ihrer Nutzbarkeit: Falsch positive Ergebnisse können durch Kontrastmittel zustande kommen, das von toten Zellen frei gegeben wurde. Außerdem verdünnt sich die Kontrastmittelkonzentration in den markierten Zellen mit jeder Zellteilung, so dass proliferierende Zellen oft nicht mehr nachgewiesen werden können.²²³

1.4.1.3 PET und SPECT

Die Positronen Emission Tomographie (PET) -Methode basiert auf der Positronen Emittierung von Radioisotopen. Der Zerfall eines Radioisotops produziert Positronen, die auf ihrem (kurzen) Weg durch Gewebe bei Kollisionen mit Molekülen Energie verlieren und letztendlich kombiniert mit Elektronen (Annihilation) zwei hochenergetische (511 keV) Gammaphotonen produzieren, die sich in entgegengesetzte Richtungen bewegen. Die Gammaphotonen werden durch ringförmige Detektoren analysiert und in ein Signal umgerechnet. Auch wenn der Nutzen von PET in seinem hochsensitiven Tracking von Biomarkern *in vivo* liegt, fehlt dieser Methode die Möglichkeit, die Morphologie abzubilden.²²⁴ PET Scanner können zusammen mit Computertomographie²²⁵ (CT) Scannern benutzt werden, um detailliertere, dreidimensionale, anatomische Strukturen sichtbar zu machen.²²⁶ Mit PET/ CT gelang es Love²²⁷, über einen Zeitraum von 2 Monaten die (geringe) Anzahl von 100.000 MSCs zu detektieren und zu lokalisieren. Die meisten klinischen PET/CT Studien benutzen radioaktive Metalle zur Markierung, z.B. ¹⁸F-fluoro-2-

221 Li et al. 2010; Yan et al. 2007

222 Li et al. 2010

223 Yan et al. 2007

224 Li et al. 2010

225 Computertomographie (CT) ist eine viel benutztes bildgebendes, radiologisches Verfahren in der Humanmedizin, bei dem Röntgenbilder aus verschiedenen Richtungen per Computer zu einem gesamten Bild mit vielen Ebenen (Schnittbildern) erstellt werden (Dufort et al. 2010). Seine Anwendung in kleinen Tieren wird durch die räumliche Auflösung begrenzt. Jüngst wurden Mikro-CTs entwickelt um Nager mit einer dreidimensionalen Auflösung von 10 bis 100 µm imagen zu können (Holdsworth et al. 2000), dennoch werden sind Anwendungen von CTs in der Forschung oft mit Positronen- oder Photonenemissionsverfahren gekoppelt, um eine verbesserte Auflösung zu erhalten (Grimm et al. 2007).

226 Dufort et al. 2010; Li et al. 2010

227 Love et al. 2007

deoxyglukose (^{18}F FDG) und ^{64}Cu . Diese können allerdings von der Zelle abgegeben werden und die Halbwertszeiten sind kurz. Alternativ kann auch das Reporter-gen Herpes simplex Virus Typ 1 Thymidin Kinase (HSV1-tk) in die Zielzellen transfiziert werden. Durch die Transfektion können allerdings die biologischen und genetischen Eigenschaften der Zellen verändert werden.²²⁸

Beim Single Photon Emissions Computed Tomography (SPECT) -Imaging werden Markierungen benutzt, die Gammastrahlen oder hochenergetische Röntgenphotonen emittieren, wie z. B_{123}I , ^{125}I , and $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Ein einzelnes Photon pro Event wird direkt ausgestrahlt. Dieses Photon interagiert mit Elektronen und Kernen naher Atome innerhalb des Gewebes. Anders als bei den Positronen verlangsamen sich diese energetischen Photonen nicht, sondern sie werden abgeschwächt. Da es nur ein Photon pro Ereignis gibt, ist die elektronische Visierung nicht möglich und ein physischer Kollimator muss hinzugefügt werden.²²⁹ SPECT kann benutzt werden um detaillierte Bilder zu machen, die hochsensitiv die Lokalisation der radioaktiven Materialien im Körper zeigen.²³⁰ Die Sensitivitäten der beiden Methoden bewegen sich im Bereich von 10^{14} – 10^{15} M für PET und 10^{14} M für SPECT, das räumliche Auflösungsvermögen liegt bei 1,3 mm für PET und im sub-mm Bereich für SPECT.²³¹

Nachteile von PET sind z. B. die wiederholte Injektion radioaktiver Marker in einen Organismus mit dem Potential von radioaktivem Schaden an gesundem Gewebe, insbesondere bei kumulativer Belastung umgebenden Gewebes. Der PET Scanner detektiert nur das Radioisotop, d. h. sobald das Isotop aus der Zelle gelassen wurde, reflektiert das PET Signal nur noch die Ortung des Isotops. Tatsächlich ist Transchelation häufig.²³² Außerdem benötigt PET Imaging die Nachbearbeitung der Bilder, was sehr zeitaufwendig sein kann.²³³

1.4.1.4 Optisches Imaging

1.4.1.5 Biolumineszenz Imaging

Im Biolumineszenz Imaging (BLI) detektiert eine Charge-coupled-device- (CCD-) Kamera grünes bis gelbes Licht, das vom Substrat Luciferin nach Oxidation durch das Enzym

228 Dufort et al. 2010; Li et al. 2010

229 Dufort et al. 2010

230 Li et al. 2010

231 Dufort et al. 2010

232 Li et al. 2010

233 Yan et al. 2007; Li et al. 2010

Luciferase (aus Glühwürmchen, Seequalle usw.) emittiert wird. Das Luciferase-Gen wird z. B. durch einen lentiviralen Vektor in das Wirtsgenom der Zielzellen integriert. Glühwürmchen (Firefly) Luciferase emittiert Licht im Beiseins ihres Substrats D-Luciferin im Wellenlängenbereich von ca. 560 nm. BLI hat wenig Hintergrundsignal und ein gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis, und es ermöglicht das wiederholte Tracking einer kleinen Anzahl von Zellen. Dieses optische Verfahren lässt sich in kurzer Zeit durchführen und ermöglicht Aufnahmen im Bereich von Sekunden bis Minuten. Die Sensitivität des BLI liegt allerdings unter der von MRT und PET. In Menschen wurde BLI aufgrund der Immunogenität der Proteine bisher selten angewandt. Außerdem ist die humane Anwendung durch hohe Absorption und Streuung von Lumineszenz in Gewebe begrenzt.²³⁴

1.4.1.6 Fluoreszenz Farbstoffe

Das Tracking mit Hilfe von Fluoreszenz basiert auf der Tatsache, dass Fluorophore Licht einer bestimmten Wellenlänge aufnehmen und anschließend Licht einer anderen Wellenlänge²³⁵ emittieren. Dieses Licht kann daraufhin durch eine hochsensitive CCD-Kamera aufgenommen werden.²³⁶ Es gibt eine Vielzahl an Fluoreszenz-Markierungen, z. B. Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE), Hoechst33342, 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI), PKH26 und lipophile Carbocyanin-Farbstoffe. CFSE erreicht ein Toxizitätslevel von 55-90% toter Zellen nach der Färbung und nur 5-6% der proliferierenden Zellen zeigen Fluoreszenz-Markierung.²³⁷ Der DNA-bindende Fluoreszenz Farbstoff Hoechst33342 kann für Kurzzeit-Zellmigrations- Experimente benutzt werden, da er schnell ausbleicht. DAPI ist ein einfacher Kernfarbstoff, der mit hoher Effizienz und ohne Zelltoxizität markiert. Da DAPI aus toten Zellen freigesetzt wird, kann es nach Zelltod zu falsch positiven Signalen kommen, so dass dieser Farbstoff ebenfalls nur für eine kurzzeitige Anwendung geeignet ist.²³⁸ PKH26 zeigt geringe Toxizität und wird dank seiner cytoplasmatischen Lokalisation nicht auf andere Zellen übertragen. Jedoch nimmt seine Fluoreszenz-Intensität graduell ab, nachdem es bei der Zellteilung auf die Tochterzellen aufgeteilt wird, was das Zeitfenster für die Benutzung von PKH26 verringert.²³⁹

234 Dufort et al. 2010; Li et al. 2010

235 Emittiert wird längerwelliges Licht als absorbiert wurde, da Energie durch den Prozess verloren ging.

236 Grimm et al. 2007

237 Hemmrich et al. 2006

238 Yan et al. 2007

239 Parish 1999

1.4.1.6.1 Lipophile Carbocyanin-Fluoreszenz-Farbstoffe

Lipophile Carbocyanin-Fluoreszenz-Farbstoffe, deren aliphatische Kohlenwasserstoffe an die Lipidschicht der Zellmembran binden, werden viel in der Forschung genutzt, da sie im Vergleich zu den cytoplasmatischen Färbungen und zu den Kernfärbungen eine geringere Zytotoxizität besitzen.²⁴⁰ Ihre Effizienz für *in vitro* und *in vivo* Markierungen im optischen Imaging wurde gezeigt.²⁴¹ In den letzten Jahren wird besonders häufig eine Reihe von langkettigen Dialkylcarbocyanin-Farbstoffen für *in vivo* Tracking und Imaging Studien in Maus und Zebrafisch genutzt: DiO²⁴², DiI²⁴³, DiD²⁴⁴ und DiR²⁴⁵, die gekennzeichnet sind durch grüne, rote, dunkelrote (far red) bzw. nahinfrarote (near infrared) Emissionen.²⁴⁶ Diese Farbstoffe haben das gleiche Markierungsprinzip und decken zusammen einen großen spektralen Bereich ab (siehe Abbildung 10), so dass sie das zeitgleiche Tracking verschiedener Zellpopulationen durch multicolour Imaging ermöglichen.²⁴⁷ DiD zeichnet sich durch eine niedrige Zytotoxizität, eine hohe Markierungseffizienz und wenig intrazellulären Transfer aus.²⁴⁸ DiR ist besonders photostabil und alle Carbocyanin-Farbstoffe sind schnell und einfach anwendbar. Obwohl sie stark mit der Lipidschicht von Zellmembranen interkalieren, konnte keine ernsthafte Zytotoxizität bei Konzentrationen beobachtet werden, die ein starkes und gleichmäßiges Anfärben gewährleisten.²⁴⁹ Es gibt allerdings zwei Einschränkungen in ihrer *in vivo* Anwendung, die auch für andere Fluoreszenz Farbstoffe gelten: 1) Reguläre Mausdiät bedingt Autofluoreszenz im Magen-Darmtrakt der Maus und 2) Mausfell und Pigmentierung bewirkt eine signifikante Reduzierung der Fluoreszenz Signal Intensität.²⁵⁰

240 Progatezky et al. 2013

241 Giepmans et al. 2006

242 DiO = DiOC18(3) (3,3'-Diocadecyloxacarbocyanin, Perchlorat), SP-DiOC18(3) ist die sulfonierte Form

243 DiI = DiIC18(3) (1,1'-Diocadecyl-3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanin Perchlorat)

244 DiD = DiIC18(5) (1,1'-Diocadecyl-3,3',3'- Tetramethylindodicarbocyanin, 4-Chlorobenzenesulfonat Salz)

245 DiR = DiIC18(7) (1,1'-Diocadecyltetramethyl indotricarbocyanin Jodid)

246 Die Farbstoffe sind als "Vibrant cell labeling solution" von der Firma Invitrogen erhältlich.

247 Progatezky et al. 2013

248 Sutton et al. 2008

249 Progatezky et al. 2013

250 Sutton et al. 2008

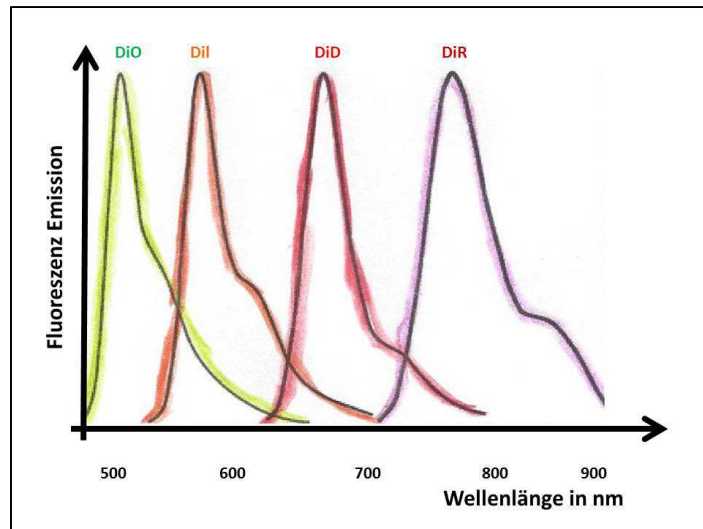


Abbildung 10: Emissions-Wellenlängen von DiO, DiI, DiD und DiR, modifiziert nach Invitrogen

1.4.1.6.2 Grünes Fluoreszenz Protein

Das Grüne Fluoreszenz Protein (GFP) ist ein 27kDa monomeres Protein, das aus der Qualle *Aequorea Victoria* stammt. Es absorbiert blaues Licht und emittiert grüne Fluoreszenz ohne exogene Substrate oder Co-Faktoren. GFP stellt eine effiziente und geeignete Methode dar, markierte Zellen zu identifizieren.²⁵¹ Zusammen mit seinen stabilisierten und verbesserten Varianten ist es das am meisten verbreitete Fluoreszenzprotein in der biologischen Forschung.²⁵² Innerhalb der letzten Dekaden wurde GFP in Zelllinien, Geweben und sogar ganzen Organismen wie der transgenen GFP-Maus für Forschungszwecke eingesetzt.²⁵³ GFP wird in allen Geweben der GFP Maus ohne nennenswerte Toxizität exprimiert; selbst in den Stammzellen des KM transgener Mäuse, die sich in Differenzierung oder Proliferation befinden, ist GFP noch nachweisbar.²⁵⁴ Auch wenn die Benutzung von Fluoreszenz Proteinen Vorteile hat, z.B. das Langzeit-Zell-Tracking, gibt es auch Nachteile, die ihre Benutzung für *in vivo* Anwendungen einschränken können: Nicht alle Reportergene geben ein ausreichend starkes Signal, das effiziente Detektion *in vivo* erlaubt. Stabile Expression von Fluoreszenz Proteinen kann durch *ex vivo* Manipulation erreicht werden, wie Transfektion/ Transduktion mit anschließender Populations- oder klonaler Selektion. Insbesondere bei Primärzellen ist jedoch das arbeitsaufwändige *in vitro* Engineering nicht immer möglich und eine Einführung ins Genom kann zu weiteren genetischen Veränderungen führen.²⁵⁵ GFP ist aufgrund seiner

251 Yan et al. 2007

252 Prohazky et al. 2013; Sutton et al. 2008

253 Prohazky et al. 2013

254 Yan et al. 2007

255 Prohazky et al. 2013

Wellenlänge schlecht geeignet, um durch Gewebe zu penetrieren, so dass nach Alternativen gesucht wird. Eine Entwicklung, die die *in vivo* Anwendung von Fluoreszenz-Proteinen beschleunigen könnte, ist die Optimierung des monomeren roten Fluoreszenz Proteins (RFP) durch Photostabilität und far-red Emission.²⁵⁶

1.4.1.6.3 Quantum Dots

Quantum Dots (QDs) sind Halbleiter Partikel mit physikalischen Eigenschaften, die sie je nach Größe dazu befähigen, Licht einer Wellenlänge zwischen 525 und 800 nm zu emittieren. QDs bestehen aus einem anorganischen Kern, einer Umhüllung aus Metall und einer äußeren, organischen Schicht.²⁵⁷ Die *in vitro* Markierung von Zellen durch QDs wird erschwert durch ihre relativ große Größe und der daraus resultierenden Diffusionsgrenze der Zellmembran. QDs können passiv durch Inkubation²⁵⁸, Elektroporation, zellulärer Mikroinjektion und Transfektionen mit kationischen Liposomen (Lipofectamine) in die Zielzellen gebracht werden.²⁵⁹ QDs können für multiplex Imaging, Einzel-QD-Tracking und 3-D Imaging Rekonstitution benutzt werden. Die hohe Lichtstreuung und die Möglichkeit des Labeltransfers von QDs *in vivo* limitiert jedoch ihre Anwendbarkeit, insbesondere ist diese beschränkt für *in vivo* Anwendungen im Gehirn.²⁶⁰

1.4.1.6.4 NIRF

Eine weitere optische, Fluoreszenz-basierte, nicht-invasive *in vivo* bildgebende Methode für Kleintiere ist das so genannte Near-Infrared-Fluorescence (NIRF)-Verfahren. Diese Methode birgt gegenüber anderen optischen Verfahren zwei Vorteile: 1) Es wird in einem „optischen Fenster“ gemessen, das sich ca. zwischen 600 nm und 1000 nm der Lichtwellenlänge befindet. In diesem Wellenlängenbereich kann die beste Gewebepenetration von Licht stattfinden, da Chromophore wie Lipide und Wasser nur im unteren bzw. im oberen Bereich des NIRF-Spektrums optisch stören. 2) Es ist die Autofluoreszenz im NIRF-Bereich niedriger als in anderen Wellenlängenbereichen des Lichts, so dass ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis erreicht wird.²⁶¹ Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Fluoreszenzdetektion im

²⁵⁶ Sutton et al. 2008

²⁵⁷ Choi and Maysinger 2008; Li et al. 2010

²⁵⁸ Der Mechanismus der zellulären Aufnahme von QDs durch Inkubation ist unbekannt, aber es wird angenommen, dass er Endozytose-vermittelt ist.

²⁵⁹ Sutton et al. 2008; Choi and Maysinger 2008; Li et al. 2010

²⁶⁰ Li et al. 2010

²⁶¹ Hilderbrand and Weissleder 2010; Frangioni 2003

NIRF-Bereich eine effizientere Anregung und Detektion in lebendem Gewebe mit weniger Lichtstreuung, Autofluoreszenz und Lichtabsorption darstellt.²⁶²

Marker Eigenschaften	Luciferase	Qdots	Magnetische Markierung	Radio-tracer
Marker lässt sich nicht auf andere Zellen übertragen	✓	—	—	✓
Marker ist nicht toxisch für die Zelle	✓	✓	?	✓
Marker verändert die Stammzellfunktionen nicht	?	✓	✓	✓
Nicht-invasive Bildgebung möglich	?	✓	?	—
Regelmäßiges <i>in vivo</i> Tracking bis zu einem Monat	✓	—	✓	✓
Detektierbar in >3 cm Hauttiefe	—	—	✓	✓
Möglichkeit zur Quantifizierung	✓	—	?	✓

Kleintiermodelle
Großtiermodelle

Abbildung 11: Vergleich aktueller Methoden zum (Stamm-) Zelltracking *ex vivo* und *in vivo*, modifiziert nach Li et al. 2010

Erläuterung zur Abbildung 11: Der Marker lässt sich nicht auf andere Zellen übertragen, wenn die genetische Information für den Marker stabil ins Genom integriert wurde. QDs und Magnetpartikel dagegen können von lebenden oder toten Zellen freigelassen und von Makrophagen aufgenommen werden. Kleine Mengen an Radiotracer, QDs und auch die Expression von Luciferase haben sich als nicht toxisch für Zellen erwiesen, Magnetpartikel hingegen können toxisch für neuronale Zellen sein. Die Stammzellbiologie (wie z. B. das Sekretom) sollte nach Möglichkeit durch eine Markierung nicht verändert werden. Die stabile Integration von Fremd-DNA in das Wirtsgenom kann, wenn sie ungünstig liegt, die Zellfunktionen beeinträchtigen. Optische Verfahren sind nicht-invasiv, allerdings muss bei der Detektion der Biolumineszenzmarkierung das Substrat kurz vor dem Imaging injiziert werden. Eisenoxide wiederum können die Stammzelldifferenzierung stören, weshalb auch das Radiotracer als invasiv eingeschätzt werden kann. Das Langzeit-in-vivo Tracking wurde für alle Methoden außer der Fluoreszenzdetektion von QDs gezeigt, die innerhalb von Tagen von den Zellen freigelassen werden, sich durch Zellteilung verdünnen oder Fluoreszenzaktivität verlieren. MR und PET werden auch im

*Menschen angewendet und zeigen eine hohe Gewebepenetration, während lichtbasierte Methoden wegen der geringen Lichtdurchlässigkeit biologischen Gewebes nur für geringfügige Durchdringung (wenige mm) geeignet sind.*²⁶³

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziele dieser Arbeit sind

- 1) einen aktuellen Wissensstand über Pharmakokinetik, Stammzelltherapien und Diabetes mellitus zusammenzustellen, um die Hintergründe für die durchgeführten *in vivo* und *in vitro* Versuche zu verstehen.
- 2) zu prüfen, welches der untersuchten Diabetes mellitus (DM) Mausmodelle am besten geeignet ist für die Untersuchungen zur MSC Pharmakokinetik im DM Mausmodell
- 3) im Tierexperiment die Pharmakokinetik von hMSCs aus Nabelschnur in Mäusen zu untersuchen und herauszufinden, ob Wildtyp-Maus und DM-Maus in der MSC-Pharmakokinetik sich unterscheiden lassen.
- 4) zu ermitteln, ob sich der Diabetesstatus der erkrankten Mäuse nach hMSCs - Injektion verändert.
- 5) durch *in vitro* Versuche das Verhalten des Markers SP-DiO zu analysieren und dabei zu prüfen, wie lange er in den Zellen erhalten bleibt, ob er auf andere Zellen übergeht und später im Blut und in den Organen detektiert werden kann.²⁶⁴
- 6) mehrere geeignete Fluoreszenzmarker zu finden, die sich sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nach dem Tod der Maus im Blut und in den Organen auf den vorhandenen hMSCs wiederfinden lassen.
- 7) Es sollten verschiedene Methoden eingesetzt und verglichen werden, um die Pharmakokinetik der hMSCs in den Mäusen zu evaluieren und diese miteinander zu vergleichen.

²⁶³ Li et al. 2010

²⁶⁴ Ein idealer Marker sollte so lange wie möglich in den Zellen erhalten bleiben, das Verhalten und die Genetik der Zellen nicht verändern. Zudem sollte er nicht auf andere Zellen übergehen und so photostabil sein, dass er später im Blut und den Organen wieder gefunden werden kann.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Tab. 5: Elektronische Geräte

Bezeichnung	Lieferant
Analysenwaage Voyager pro	Ohaus
Cedex XS Analyzer	Roche Applied Science
DISCOVERY XT	Ventana
FACS Canto II	BD Biosciences
Fluoreszenzmikroskop AXIO Observer Z1	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop Leica DM	Leica
Gefrierschrank Gastro 425L	Liebherr
Heraeus Multifuge X3	Heraeus
Heraeus XR3 Multifuge	Heraeus
Inkubator Heracell 150i	Heracell
Inkubator Heracell 150i-mit O2-Regelung	Heracell
Inkubator Heracell 240i	Heracell
Laser BD FACS Canto	Becton Dickinson (BD)
Leica DFC 295 digitale Kamera	Leica
Light Cycler 480 II mit 96-well Block	Roche
Maestro™ Imaging Systems	PerkinElmer
Nano Drop ND 2000	Nano Drop
QIAGEN TissueLyser	QIAGEN
Sicherheitswerkbank Klasse II Typ BDK-S 1200	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH
Standkühlschrank Liebherr FKS5000	Liebherr
Stickstofflagerbehälter Biosafe 420SC	Air Liquide
Tiefkühlschrank -85 Grad GFL	Thermo Scientific
Zentrifuge Eppendorf 5424R	Eppendorf
Zentrifuge Eppendorf 5430R	Eppendorf
Zentrifuge Heraeus X3	Heraeus

2.1.1.1 Zellkultur Equipment

Tab. 6: Zellkultur Equipment

Bezeichnung	Lieferant
Analysenwaage Voyager pro	Ohaus
Fluoreszenzmikroskop AXIO Observer Z1	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop Leica DM	Leica
Gefrierschrank Gastro 425L	Liebherr
Heraeus Multifuge X3	Heraeus
Heraeus XR3 Multifuge	Heraeus
Inkubator Heracell 150i	Heracell
Inkubator Heracell 150i-mit O2-Regelung	Heracell
Inkubator Heracell 240i	Heracell

Laser BD FACS Canto	Becton Dickinson (BD)
Leica DFC 295 digitale Kamera	Leica
Light Cycler 480 II mit 96-well Block	Roche
Nano Drop ND 2000	Nano Drop
Sicherheitswerkbank Klasse II Typ BDK-S 1200	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH
Standkühlschrank Liebherr FKS5000	Liebherr
Stickstofflagerbehälter Biosafe 420SC	Air Liquide
Tiefkühlschrank -85 Grad GFL	Thermo Scientific
Zentrifuge Eppendorf 5424R	Eppendorf
Zentrifuge Eppendorf 5430R	Eppendorf
Zentrifuge Heraeus X3	Heraeus
Neubauer Zählkammer	Carl Roth
Superfrost Plus slices Objektträger	Gerhard Menzel GmbH
24 well-Platte	Corning
15 ml konisches, Polypropylen-basiertes Zentrifugations Röhrchen	BD Biosciences
Vectashield Hard Set (H-1500), Mounting Medium	Vectashield

2.1.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Tab. 7: Chemikalien, Reagenzien und Puffer

Bezeichnung	Lieferant
0,05% Trypsin-EDTA	Invitrogen
Alpha MEM ohne Glutamin	Lonza
Citratpuffer, 0,1M	Sigma-Aldrich
Collection Tubes (2 ml)	QIAGEN
Dimethyl Formamid (DMF)	Sigma-Aldrich
DNase I	Sigma-Aldrich
DNeasy Mini Spin Columns in 2 ml Collection Tubes	QIAGEN
DPBS	Lonza
DPBS ohne Ca ²⁺ and Mg ²⁺	Lonza
Eosin	Merck
Essigsäure	Merck
FBS	Gibco
Formaldehyd Lösung 37%	Merck
GlutaMAX-I	Gibco
Hämatoxylin	Merck
Hyaluronidase	Appllichem
Kollagenase CLS I	Biochrom
Lyse-Puffer nach S. Reichhuber	100mM NH ₄ Cl + 5mM Hepes + 0,5mM KHCO ₃ + 0,1mM EDTA Roche
Methylenblau Färbelösung nach Ehrlich	Fluka
Mytomycin C	Sigma-Aldrich
Paraffin	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin (PenStrep)	Gibco
Proteinase K	QIAGEN
Puffer AE	QIAGEN

Puffer ATL	QIAGEN
Puffer AW1	QIAGEN
Puffer AW2	QIAGEN
Quantifiler Human DNA Standard	ABI
Quantifiler PCR Reaction Mix (AmpliTaQ Gold® DNA Polymerase, dNTPs mit dUTP, Passive Referenz, optimierte Puffer Komponenten)	ABI
Quantifiler® Human Primer Mix	ABI
SP-DiIC18(3) (#D7777)	invitrogen
Standard Kultur Medium	Alpha MEM ohne Glutamin + 10% FCS + 1% PenStrep + 1x GlutaMAX-I
Streptozotocin	Sigma-Aldrich
T10E0.1 Puffer: – 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) – 0.1 mM Na ₂ EDTA	Merck Sigma-Aldrich
Vybrant DiD (#V-22887) Zellfärbelösung	Invitrogen

2.1.1.3 Zelllinien

Tab. 8: Zelllinien

Bezeichnung	Lieferant
Murine MSC Linie aus KM einer p53-/- C57/Bl6 Maus (Conrad et al. 2009)	Apceth GmbH

2.1.1.4 Kits

Tab. 9: Kits

Bezeichnung	Lieferant
Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit	Applied BioSystems
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen

2.1.1.5 Antikörper

Tab. 10: Antikörper für die RCA und die ICC

Antigen	Wirts Spezies	Ziel Spezies	Isotyp	Fluoreszenz	Firma	Bestellnummer	Klon
CD73	Maus	Mensch	IgG1	PE	BD	550257	AD2
CD49d	Maus	Mensch	IgG1, κ	APC	BD	559881	9F10
CD105	Maus	Mensch	IgG1	PE	BD	560839	266
CD90	Maus	Mensch	IgG1, κ	PE	BD	555596	E510
CD54	Maus	Mensch	IgG2b, κ	PE	BD	347977	LB-2

CD106	Maus	Mensch	IgG1, κ	FITC	BD	551146	51-10C9
CD273	Maus	Mensch	IgG2a, κ	APC	Biolegend	329608	24F.10C12
CD274	Maus	Mensch	IgG2b, κ	PE	Biolegend	329706	29E.2A3
CD184	Maus	Mensch	IgG2a, κ	APC	BD	560936	12G5
Insulin	Meerschweinchen	Schwein	-	-	Dako	A0564	-

Tab. 11: Antikörper für die FACS Analyse

Antigen	Wirts Spezies	Ziel Spezies	Isotyp	Fluoreszenz	Firma	Bestellnummer	Klon
CD11b	Maus	Mensch	IgG1, κ	APC	BioLegend	301410	CBRM1/5
CD14	Maus	Mensch	IgG2a, κ	PE	BD	555398	M5E2
CD19	Maus	Mensch	IgG1, κ	PE	BD	345777	4G7
CD34	Maus	Mensch	IgG1, κ	APC	BD	555824	581
CD45	Maus	Mensch	IgG1, κ	APC	BD	555485	HI30
CD73	Maus	Mensch	IgG1, κ	PE	BD	550257	AD2
CD90	Maus	Mensch	IgG1, κ	PE	BD	555596	5E10
CD105	Maus	Mensch	IgG1, κ	PE	BD	560839	266
HLA-DR	Maus	Mensch	IgG2a, κ	PE	BD	555812	L243 (G46-6)

Tab. 12: Antikörper Isotypkontrollen und Sekundärantikörper

Isotyp	Isotypkontrolle	Fluoreszenz	Firma	Bestellnummer	Klon
IgG1, κ	Maus	APC	BD	550854	MOPC-21
IgG2a, κ	Maus	PE	BD	556653	G155-178
IgG1, κ	Maus	PE	BD	559320	MOPC-21
IgG2a, κ	Maus	APC	BD	550882	G155-178

2.1.1.6 Zubehör für das Ventana Histologie System IHC

Tab. 13: Zubehör Ventana System

Reagenz	Bestellnummer
Ventana DAB Map TM Kit	Cat.05266360001
Ventana Bluing Reagent B2	Cat.05266769001
Ventana Hematoxylin II H2	Cat. 05277965001
Ventana Endogenous Biotin Blocking Kit B1	Cat. 05266092001
AB Diluant D4	Cat. 05266319001
Goat Serum G1	Dako X 0907
Ventana Hämatoxylin II H2	Cat: 05277965001
Ventana Bluing Reagent B2	Cat: 05266769001

2.1.1.7 Mausstämme

Tab. 14: Mausstämme

Bezeichnung	Lieferant
BALB/cAnNTac (Balb/c)	Taconic
NOD/ShiLtJ (NOD)	Charles River Laboratories

2.1.1.8 Materialien für Maushaltung, Tierversuche und Sektion

Tab. 15: Spezielle Materialien für die Haltung von Mäusen, für Tierversuche und Sektion

Bezeichnung	Lieferant
Accu-Chek Aviva Blutzuckermessgerät [mg/dl]	Roche
Accu-Chek Teststreifen, Aviva	Roche
Autoklaviertes, pelletiertes Nagerfutter, Standard-Diät, Nr. 3337016	Provimi Kliba
Bezeichnung	Lieferant
EDTA-Röhrchen (Microvette K3E)	Sarstedt
Einmal-Injektions-Kanülen, Ø 0,45 * 25 mm	Braun
Einmalspritzen sterilisiert, pyrogenfrei, 1 ml	Dispomed
Einstreu (autoklaviertes Weichholzgranulat, Lignocel)	Ssniff
Fusselfreie Tücher (Kim wipes)	Kimberley-Clark Corp.
Hämatokrit-Kapillare mit EDTA ²⁶⁵ (1,5 mm Durchmesser, 75 µl Inhalt)	Hirschmann Laborgeräte
Kanülen 18 - braun Ø 0,45 x 25mm 26G x 1	Sterican
Kunststoffkäfig (1500U Eurostandard Typ IV S 480 x 375 x 210 mm - Käfignutzfläche 1500 cm ²)	Tecniplast
Metallgitterdeckel (außenliegender Deckel mit Gitterseiten)	Tecniplast
Nageholz, Größe S	Abedd
Nestbaumaterial aus Hanf	Ssniff
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Eppendorf
Plasma-Röhrchen (Microvette 500 LH-Gel)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (verschiedene Größen)	Falcon
Sezierbesteck	Thalheimer
Skalpellklinge	Bayha
Bestrahltes, chlorophyllfreies Hochfett-Nagerfutter, Nr. 2127 0708	Provimi Kliba
Bestrahltes, chlorophyllfreies Nagerfutter, Nr. 2222 0708	Provimi Kliba
Tränkewasser	autoklaviertes Stadtwasser, Penzberg
Pipetten, verschiedene Größen (1-1000µl)	Eppendorf
Inhalationskammer	Roche Penzberg, Werkstatt
Inhalationsmaske	Roche Penzberg, Werkstatt
Isofluran ²⁶⁶ (Inhalationsanästhetikum)	CP-Pharma
Narkoseeinheit (inkl. Flow Meter)	Roche Penzberg, Werkstatt

²⁶⁵ Ethylendiamintetraacetat

²⁶⁶ 1-Chloro-2,2,2-Trifluoroethyl Difluoromethyl Ether

2.1.1.9 Maushaltung

Die Mäuse²⁶⁷ wurden im spezifisch pathogenfreien Bereich der Tierhaltung Roche Penzberg in Gruppen von 2-5 Tieren in Kunststoffkäfigen der Kategorie IVS unter spezifischen klimatischen Bedingungen gemäß den Richtlinien der Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA)²⁶⁸ gehalten, siehe Tab. 15. Die Käfige enthielten Einstreu, ein Hanfpad zum Nestbau und ein Stück autoklaviertes Holz zum Nagen. Auf den Metallaußengittern auf den Käfigen standen den Mäusen pelletiertes Futter und Wasser in Trinkflaschen *ad libitum* zur Verfügung. Zwischen 6 Uhr morgens und 18 Uhr abends (Tag/Nacht Rhythmus von 12h / 12h) wurden die Mausställe beleuchtet.

Tab. 16: Klimatische Bedingungen in der Tierhaltung Roche, Penzberg

Temperatur	22 °C (20 -24 °C)
Luftfeuchte	55 % (45 – 70 %)
Luftwechselrate	15 -20 l/h
Tag/Nacht-Rhythmus	12h/12h

2.1.1.10 Software

Tab. 17: Software

Software /Verwendungszweck	Firma
Statistische Tests: R (Version 2.12.0)	R-project.com
FACS Analyse mit FlowJo Software	Tree Star
NIRF Maestro Auswertung mit der Nuance Software	Perkin Elmer
NexES v9.30 für die Discovery XT Immunhistochemie	Ventana
Light Cycler 480 Software für die Datenanalyse der Real- Time-PCR	Roche Diagnostics

267 Die Behandlungen und Versuche mit allen in dieser Arbeit aufgeführten Mäusen wurden durch die Veterinärbehörde Oberbayern genehmigt unter folgenden Aktenzeichen: Az. 55.2-1-54-2531-72-10 und Az. 55.2.1.54-2532-160-11

268 Guillen 2012

2.2 Methoden

2.2.1.1 Zellexpansion: Expansion von MSCs aus UC und KM

Einen Tag nach der Isolierung wurde das Kulturmedium mitsamt den darin enthaltenden zellulären Trümmern und nicht-adhärenenten Zellen entfernt und erneuert. Die KM Kulturen wurden vor dem ersten Mediumwechsel dreimal mit DPBS gespült. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70-90% mit 0,05% Trypsin/EDTA von der Kulturschale abgelöst und in einer Dichte von 1000 Zellen/cm² neu ausgesät.

2.2.1.2 Histologische Färbungen

UC und Mausorgane wurden für 24h in 10% neutralisierender Formalin-Lösung inkubiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Es wurden 4 µm dicke Schnitte mit Mikrotomen angefertigt und auf Superfrost Plus Objektträgern aufgetragen. Für die konventionelle Lichtmikroskopie wurden die Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin (HE) mit Standardmethoden gefärbt.

2.2.1.3 Immunhistochemie

Es wurden zunächst Paraffinschnitte der fixierten Mauspankreatia in 4 µm Dicke hergestellt und auf Objektträger gezogen. Die Färbungen wurden mit dem Gerät Discovery XT mit Standardreagenzien und mit Hilfe der Software NexES v9.30 durchgeführt. Die Färbung des murinen Insulins erfolgte indirekt durch die LSAB Methode (Labelled Streptavidin-Biotin). D.h. es wurde zunächst entparaffiniert und mit 20% Ziegenerum für 12 Minuten freie Bindungsstellen blockiert. Die Kopplungsreaktion mit dem 1:1000 in Discovery Antibody Diluent verdünnten Erstantikörper Insulin (A0564 von Dako) fand für 20 Minuten bei 37°C statt. Anschließend wurde manuell gespült und acht Minuten lang bei 37°C der Sekundärantikörper (Biotin Donkey anti Guinea Pig, JACKSON ImmunoResearch) 1:100 in Discovery Antibody Diluent inkubiert. Es wurde eine Kernfärbung mit Hämatoxylin II H2 für 4 Minuten, sowie Bluing Reagent B2 (beide von der Firma Ventana) für 4 Minuten angeschlossen. Daraufhin wurden die Objektträger in heißem Leitungswasser, a. dest. (destilliertem Wasser), einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol gespült, bevor sie eingedeckelt wurden.

2.2.1.4 Zellzählung

Es wurden 20 µl einer Zellsuspension in eine Seite einer Neubauer Zählkammer pipettiert und lichtmikroskopisch die detektierbaren Zellen gezählt und mit den für diese Kammer geltenden Faktoren multipliziert um auf Zellen/ ml zu kommen. Über die Ermittlung der Populationsverdoppelung wurde die Verdoppelungszeit berechnet:

Die Populationsverdopplungen (PD) und die Verdopplungszeit (DT) wurden ausgerechnet unter Verwendung folgender Gleichungen:

$$PD = \log_2\left(\frac{c_{tx}}{c_{t1}}\right)$$

wobei c_{t1} die Anzahl der Zellen an Tag 1 ist (Zellen/cm²) und c_{tx} die Zellzahl am Tag der Ernte.

$$DT = \frac{\Delta t}{PD}$$

wobei Δt die Kultivierungszeit ist.²⁶⁹

2.2.1.5 Zellen einfrieren und auftauen

Die Zellen wurden für 90 s bei 37°C im Wasserbad aufgetaucht und anschließend in 10 ml Medium suspendiert. Nach Zentrifugation für 5 Minuten bei 300g wurde der Überstand verworfen und die Zellen in einem vorgegebenen Volumen Kulturmedium aufgenommen, anschließend wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer die Zellzahl ermittelt. Für die Zellexpansion wurden die Zellen in regulären Zellkulturflaschen mit 500 – 1.000 MSCs/cm² und 2.500 – 5.000 MSCs/ml ausgesät. Das Medium wurde alle drei bis vier Tage erneuert bis eine Konfluenz von 70-90% erreicht war. Dann wurden die Zellen einmal mit Mg²⁺-, Ca²⁺-freiem DPBS gewaschen und mit Hilfe von 0,05% Trypsin-EDTA (7 ml pro 175cm² Flasche, 5 min bei 37 °C vorgewärmt) abgelöst. Nach einer Inkubationszeit von ca. drei Minuten im 37°C Schrank wurde das Trypsin durch Zugabe der 2-3fachen Menge Zellkulturmedium inaktiviert. Zellzahl und Viabilität wurden bestimmt mit einer Trypanblau Exklusionsmethode in einem Hämocytometer oder in einem Cedex XS Analyzer für das Zellzählen. Für das

²⁶⁹ siehe „Der Experimentator“ Schmitz 2009:216

Passagieren wurden die Zellen auf neue Zellkulturflaschen ausgesät. Für das Einfrieren wurde eiskaltes Kryomedium, bestehend aus 90% FCS und 10% DMSO, verwendet. Dabei wurden die Zellen vorsichtig in Konzentrationen von $1-5 \cdot 10^6$ Zellen/ml resuspendiert, und es wurde 1 ml der Zellsuspension in Kryovials pipettiert. Danach wurden die Vials sofort in einen bei 4°C vorgekühlten Einfriercontainer gelegt und über Nacht im -80 °C Schrank gelagert, wodurch eine konstante Kühlrate von 1 °C/min gewährleistet ist. Ab dem Folgetag wurden die Zellen in Flüssigstickstoff gelagert.

2.2.1.6 Isolierung von MSCs aus menschlicher Nabelschnur

Nabelschnüre wurden nach Kaiserschnittgeburten vom Roten Kreuz Oberösterreich geliefert. KM gesunder Freiwilliger wurde von Lonza geliefert. Die Spender hatten eine von der Ethikkommission genehmigte Einwilligung nach Aufklärung schriftlich unterzeichnet.

UC-MSCs wurden nach Seshareddy²⁷⁰ mit Modifikationen isoliert. Die Nabelschnur wurde gewogen und in kleine Stücke geschnitten. Die Stücke wurden in 1 ml DPBS ohne Ca^{2+} und ohne Mg^{2+} , mit 530 U/ml Kollagenase CLS I, 674 U/ml Hyaluronidase und 25 µg/ml DNase I für 6 h bei 37°C im Schüttel-Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit 20.000 Zellen/cm² in Standard Kulturmedium ausplattiert.

Humane Knochenmark MSCs wurden nach Pittenger²⁷¹ durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Die MSC-angereicherte Fraktion wurde dann bei einer Dichte von 200.000 Zellen/cm² in Standard Kulturmedium ausplattiert.

2.2.1.7 Zellkultivierung und –expansion

Die MSCs wurden bei 70-90% Konfluenz passagiert: Hierfür wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch DPBS ohne Magnesium und Kalzium ersetzt, anschließend wurde das DPBS durch 3 ml 0,5% Trypsin ersetzt. Die Zellkulturflasche wurde für 3-5 Minuten in den 37°C Inkubator gestellt, die Flasche auf eine harte Oberfläche geklopft und anschließend das Ablösen der MSCs mikroskopisch beobachtet. Wenn die Zellen abgelöst und nur wenige bis keine Zellaggregate mehr sichtbar waren, wurde das Trypsin durch die 3-5-fache Menge Standard Kulturmedium inaktiviert. Die Zellsuspension wurde mit einer Pipette gemischt und

270 Seshareddy et al. 2008

271 Pittenger et al. 1999

20µl für die Analyse unter der Neubauer Zählkammer entnommen. Der Rest der Zellsuspension wurde bei einer Beschleunigung von 350g für 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und frisches Standard Kulturmedium hinzugefügt, so dass eine MSC Konzentration von 5000 MSC/ml erreicht wurde, die nach der Ausplattierung in eine Zellkulturflasche 1000 MSC/cm² entspricht.

Das Zellkulturmedium wurde alle 3-4 Tage durch ein bei 37°C vorgewärmtes frisches Medium erneuert.

2.2.1.8 Immunosuppressive Eigenschaften von MSCs *in vitro*

MSCs üben einen immunmodulatorischen Effekt aus, darunter die Inhibition der T-Zell-Proliferation²⁷².

Immunologische Eigenschaften von MSCs wurden durch ein *in vitro* co-Kultur System bewertet. Dazu wurden MSCs mit humanem peripheren Blut mononukleären Zellen (PBMCs) kokultiviert, wie bereits in Hartman²⁷³ und Quah²⁷⁴ beschrieben. In diesem Test wurden PHA-stimulierte, allogene PBMCs in direkter Cokultur mit MSCs in einem Verhältnis von 1:10 kultiviert. Peripheres Blut wurde von gesunden Freiwilligen in einem 5 ml Vacutainer Tube inklusive 12,35 mg Natrium Citrat und 2,21 mg Zitronensäure aufbewahrt. Das Vollblut wurde auf einen Ficoll-Paque PLUS von GE Healthcare überlagert und bei einer Beschleunigung 1.200 g für 20 Minuten zentrifugiert. PBMCs wurden aus der Ficoll-Plasma Grenzfläche gewonnen, einmal mit sterilem DPBS gewaschen und zu $20 \cdot 10^6$ /ml DPBS mit 5% FCS von PAA Laboratories für die CFSE Färbung verdünnt. PBMCs wurden mit CFSE nach Herstellerangaben der Firma Sigma-Aldrich gefärbt.

25.000 MSCs mit oder ohne 20 ng/ml TNF-α und 20 ng/ml INF-γ (beide Cytokine stammen von Roche Applied Science) wurden in Triplikaten in Flachboden 24 Well-Platten der Firma Corning ausgesät und konnten über Nacht adhären. Am nächsten Tag wurden $2.5 \cdot 10^5$ CFSE-gefärbte PBMCs (mit oder ohne Stimulierung durch 0.5 µg/ml phytohemagglutinin-L (PHA-L der Firma Roche Diagnostics) in Standardkulturmedium pro Well hinzugefügt. Nach

272 Fiorina et al. 2009; Newman et al. 2009; Shi et al. 2010

273 Hartmann et al. 2010

274 Quah et al. 2007

der Cokultivierung mit MSCs bei 37°C in 5% CO₂ Atmosphäre für sechs Tage wurden die PBMCs gewaschen und in DPBS/2% FCS resuspendiert. Anschließend wurden sie durch Flow Cytometry analysiert mittels des FACS Canto II von BD Biosciences. Die Datenanalyse wurde mit Hilfe der FlowJo software von Tree Star durchgeführt.

2.2.1.9 MSC Membranfärbung mit SP-DIO und DID

Die Stammlösung des Membranfarbstoffs DID war gebrauchsfertig. Aus dem sulfonierten DiO-Derivat SP-DIOC₁₈(3) der Firma Invitrogen Technologies, das als Puder vorliegt, wurde mit Hilfe von Dimethylformamid (DMF) eine Stammlösung hergestellt: 5 mg SP-DIO Pulver wurde in 5 ml Dimethylformamid (DMF) gelöst, mit einer Konzentration von 1 mg/ml (Stammlösung).

Herstellen der Zell-Färbelösung aus der Stammlösung und Färbeprotokoll:

Aufgetaute MSCs aus UC der Passage 4 wurden bei RT und bei einer Beschleunigung von 300 g für 5 Minuten zentrifugiert und in einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ ml in DPBS resuspendiert. Pro ml der Zellsuspension wurde 5 µl der Färbe-Stammlösung (SP-DIO oder DID) hinzu pipettiert, so dass die Zell-Färbelösung ca. 5 µM konzentriert war. Die Zellen wurden sanft durch Pipettieren gemischt und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert, währenddessen sie mehrfach durch Schwenken neu vermischt wurden. Anschließend wurden die Zellen bei Raumtemperatur und bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden in eine Dichte von 10^6 Zellen/ 200µl resuspendiert.

2.2.1.10 Fluorescence-activated-cell-sorting Analyse

Zur Fluorescence-activated-cell-sorting (FACS) Analyse wurden ungefähr 100.000 MSCs in 100 µl von DPBS mit 2% FCS suspendiert und mit 1 µg des spezifischen Antikörpers oder der Isotypkontrolle für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS/2% FCS wurden die Zellen in DPBS/2% FCS resuspendiert und durch das Flow Cytometer analysiert. Für die Datenanalyse wurde die FlowJo software der Firma Tree Star verwendet.

2.2.1.11 *In vitro* Differenzierung der MSCs

MSCs aus UC, AM und KM wurden nach drei Passagen in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten differenziert. Für die adipogene und die osteogene Differenzierung wurden 20.000 MSCs/cm² in 12-well-Platten ausgesät und unter Standardkulturbedingungen bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden dann mit adipogenem oder osteogenem Differenzierungsmedium für 2 bzw. 2 bis 3 Wochen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in 4% Formaldehyd fixiert. Um die adipogene Differenzierung sichtbar zu machen, wurden die Lipidtropfen der differenzierten Zellen mit Red Oil O gefärbt. Osteogen differenzierte Zellen wurden mit Alizarin Red S gefärbt. Kontrollzellen wurden für die gleiche Zeitspanne unter Standardkulturbedingungen gehalten. Für die chondrogene Differenzierung wurden 250.000 MSCs für 5 Minuten bei 150g in einem konikalen, Polypropylen-basierten 15 ml Zentrifugationsröhrchen zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in chondrogenem Medium für drei Wochen kultiviert, während die Kontrollpellets für drei Wochen in Standardkulturmedium kultiviert wurden. Nach drei Wochen wurden die Pellets in 4% Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Schnitte wurden auf Objektträger gebracht und mit Alician Blau gefärbt.

2.2.1.12 Beschreibung der verwendeten Mauslinien

2.2.1.13 NOD Mäuse

NOD Mäuse (nonobese diabetic mice) sind ein Tiermodell für juvenilen Diabetes. Diese Mäuse entwickeln, wie in der Einleitung erwähnt, spontan einen T-Zell basierten Diabetes mellitus und teilen viele der klassischen Merkmale des Typ 1 Diabetes beim Menschen wie das Vorhandensein von Lymphozyten Infiltrationen in den Inseln des Pankreas vor dem Beginn des klinischen Diabetes, Insulinopenie, Hyperglykämie, Polyurie und Gewichtsverlust²⁷⁵. Nach einigen Wochen des klinischen Diabetes entwickeln diese Mäuse ebenfalls eine Ketose und sterben, wenn sie nicht mit Insulin behandelt werden. Anders als im Menschen wird im NOD Mausstamm eine geschlechtsspezifische, erhöhte Inzidenz an Diabetes bei Weibchen beobachtet, so dass für die Mausversuche ausschließlich weibliche Mäuse verwendet wurden. Umweltfaktoren spielen bei der Inzidenz sowie dem Beginn des Diabetes eine Rolle²⁷⁶, so dass bei Versuchsbeginn nicht bekannt war, wie viele Mäuse in

²⁷⁵ Makino et al., 1980

²⁷⁶ Leiter et al., 1990

welcher Zeitspanne spontan diabetisch sein würden. Die spontane Diabetesrate bei NOD Weibchen schwankt, wie sich in den durchgeführten Versuchen zeigte, zwischen 60% und 80%.²⁷⁷ Es wurden ausschließlich diabetische Mäuse in die Versuchsgruppen der Stammzelltherapie aufgenommen, wobei als Kriterium für diabetische Mäuse ein Blutglukosewert von mehr als 300 mg/dl an zwei hintereinander folgenden Messungen festgelegt wurde.

2.2.1.14 Balb/c

Die Wildtyp Mäuse Balb/c von Jackson Lab. sind ein gängiges Albino Mausmodell mit H2^d Hintergrund²⁷⁸. In den Versuchen wurden ausschließlich weibliche Mäuse verwendet.

2.2.1.15 Blutzuckerbestimmung

Den Mäusen wurde einmal wöchentlich abwechselnd die rechte bzw. linke Schwanzvene an jeweils verschiedenen Stellen punktiert und ca. 5µl Blut entnommen. Dieses Blut wurde mit Hilfe des Roche Akku Check auf den Blutzuckergehalt getestet.

2.2.1.16 Diabetes Ausbruch (Onset) bei NOD Mäusen

Die NOD Mäuse wurden in zwei Gruppen aufgeteilt: 1A (unbehandelt) und 1B (mit Cyclophosphamid behandelt).

Zu 1A: Weibliche NOD Mäuse erkrankten zwischen der 20. und 50. Lebenswoche, je nach Sterilität der Haltungsbedingungen, zu 60-80% spontan an autoimmunem Diabetes, weshalb der Diabetes Status ab der 10. Lebenswoche einmal wöchentlich überwacht werden musste. Es ist laut Karuonos u. Goes 2003 für Kurzzeitstudien vertretbar, an Diabetes erkrankte Mäuse 4 Wochen lang ohne Insulin Therapie zu halten. Aus Gründen des Tierschutzes wurden Versuchs- Kontroll- und Reservetiere spätestens nach einem 4 Wochen andauernden Diabetes tierschutzrechtlich korrekt durch transzervikale Dislokation euthanasiert. Die Zielorgane wurden anschließend entnommen und histologisch untersucht.

Zu 1B: NOD Mäusen dieser Gruppe wurde das alkylierende Agens Cyclophosphamid 200 mg/kg i.p. in einer Konzentration von 20 mg/ml in 0,9% Kochsalzlösung in ca. 200 µl gespritzt wie in Brode et al. 2006 beschrieben. Der Diabetes Status wurde, wie bei den NOD

²⁷⁷ Anderson u. Bluestone 2005

²⁷⁸ <http://www.criver.com/>

Mäusen der Gruppe 1A, eine Woche nach der Cyclophosphamid-Injektion, spätestens aber ab der 10. Lebenswoche einmal wöchentlich überwacht.

2.2.1.17 Diabetes Ausbruch (Onset) bei Balb/c Mäusen

Die Balb/c Mäuse wurden in zwei Gruppen aufgeteilt: 2A (5-mal niedrig dosiertes Streptozotocin) und 2B (1-mal hoch dosiertes Streptozotocin mit Fettdiät).

Zu 2A: Im Rahmen dieser Studie wurden weibliche Balb/c Mäuse verwendet, denen im Alter von 6 – 8 Wochen Streptozotocin injiziert wird wie in Paik et al., 1980 für Balb/c Mäuse beschrieben: Die Streptozotocingabe erfolgte jeweils morgens nach einer Nacht des Fastens, d.h. es wurde kein Futter sondern nur Wasser bereitgestellt. Es wurde an 5 aufeinanderfolgenden Tagen intraperitoneal (i.p.) Streptozotocin in einer Dosierung von 40 mg/kg in 0,1 M Citratpuffer aufgelöst mit einem pH-Wert von 4,5. Die Konzentration des Streptozotocins ist 4 mg/ml, d.h. den Mäusen wurden ca. 200 µl gespritzt. Die so behandelten Mäuse entwickeln laut Literatur nach ca. 12 Wochen einen stabilen Diabetes (Glukosespiegel > 300mg/dl). 16 Tage nach Injektion wurden die Mäuse gewogen und die Blutglukosewerte wurden gemessen, was wöchentlich wiederholt wurde. Hierzu wurde Blut mit Sticks von Accu Check der Firma Roche untersucht.

Zu 2B: Die zweite Gruppe der Balb/c Mäuse erhielt zusätzlich zur Streptozotocingabe eine besonders fetthaltige Diät (35,5% statt 4,5% Fett). Durch die Diät kann im Gegensatz zu normal ernährten Mäusen ein Diabetes auch nach nur einmaliger Gabe von 100 mg/kg Streptozotocin pro kg Körpergewicht der Maus entstehen.²⁷⁹ In diesem Mausmodell ist nach ca. 4 Wochen Diät und der Streptozotocingabe nicht nur der partielle β -Zell-Verlust eines Typ2-Diabetes sondern zusätzlich die in menschlichen Patienten mit Typ 2 Diabetes vorkommende Insulinresistenz vorhanden.²⁸⁰ Den Mäusen wurde einmalig Streptozotocin in einer Konzentration von 10 mg/ml 0,1 M Citratpuffer injiziert, d.h. das Endvolumen betrug ca. 200 µl. Die Streptozotocingabe erfolgte morgens nach einer Nacht des Fastens. Die wöchentliche Blutzuckerbestimmung wurde wie bei den anderen Mausgruppen beschrieben durchgeführt.

²⁷⁹ Luo et al., 1998

²⁸⁰ Luo et al., 1998

2.2.1.18 MSC Transplantation

$1 \cdot 10^6$ hMSCs, in einem Volumen von 200 μ l isotonischer Lösung, wurden langsam intravenös in die Schwanzvene der Maus injiziert.

2.2.1.19 Organentnahme

Bei Beendigung des Versuchs wurden die Mäuse unter tiefer Isoflurannarkose retroorbital ausgeblutet (500-800 μ l Blut) und anschließend gestreckt um einen Genickbruch zu initiieren. Nach Feststellung des Todes wurden folgende Organe entnommen und zur weiteren histologischen bzw. PCR-Aufarbeitung geteilt: Herz, Lunge, Leber, Milz, Pankreas, Nieren und Knochenmark. Das Knochenmark wurde aus dem großen Oberschenkelknochen durch Spülung mit 200 μ l steriler PBS-Lösung gewonnen. Die Organhälfte für die Histologie wurde anschließend für 24h in 4%iger Formalin-PBS-Lösung für die spätere Einbettung fixiert, die andere Organhälfte bei -70°C bis zur Prozessierung für die PCR Analyse eingefroren.

2.2.1.20 DNA Gewinnung aus Mausgeweben

Um DNA aus den eingefrorenen Mausorganen zu gewinnen, wurden diese aufgetaut und für Lunge, Leber, Niere und Pankreas jeweils ein 25 mg großes Stück abgewogen und abgetrennt. Bei Milzproben wurden 10 mg abgeschnitten. Die Organe wurden anschließend in ein 1,5 ml Eppendorf Tube überführt und 180 μ l Puffer ATL hinzu pipettiert. Anschließend wurden die Organe mit Hilfe des QIAGEN TissueLyser für ca. zwei Minuten homogenisiert. Alle folgenden Reagenzien sind Teil des DNeasy Kit von QIAGEN. Es wurden 20 μ l Proteinase K zu dem homogenisierten Gewebe pipettiert und das Röhrchen für eine Minute gevortext. Es wurde dann auf einem temperierten Schüttler bei 56°C für mindestens 1,5 h inkubiert, bis eine homogene, bräunliche Suspension ohne Klumpen entstanden war. Anschließend wurde erneut gevortext für 15 s. 200 μ l Puffer AL wurde zur Probe pipettiert und die gesamte Probe noch einmal stark gemischt. Dann wurden 200 μ l Ethanol (96%) hinzugefügt und wieder gemischt. Die Probe wurde dann in eine DNeasy Mini spin Säule überführt und mit jeweils 500 μ l Puffer AW1 und AW2 gewaschen. Anschließend wurde in der Säule gebundene DNA durch 200 μ l Puffer AE bei einer Beschleunigung von 6000g eluiert und in einem 1,5 ml Eppendorf Röhrchen aufgefangen. 1,5 μ l der so gewonnenen Probe wurde durch den Nano Drop photometrisch gemessen und das Messergebnis (die DNA Konzentration) notiert sowie daraus die DNA Verdünnung für eine Endkonzentration der Probe von 300 ng / μ l berechnet.

Anschließend wurde die Probe für den PCR Ansatz mit Puffer AE entsprechend dem Rechenergebnis verdünnt.

Für die 500 µl Blut und 200 µl KM pro Mausprobe wurde das Protokoll in ähnlicher Weise durchgeführt: Im ersten Schritt entfiel die Homogenisierung, dafür wurde zu KM 20 µl Proteinase K und zu 10 µl Blut ebenfalls 20 µl Proteinase K sowie 190 µl steriles PBS pipettiert. Dann wurde 200 µl Puffer AL (ohne Ethanol) hinzu pipettiert und für 15 s gevortext. Im nächsten Schritt wurde bei 56°C für 10 Minuten inkubiert und 200 µl Ethanol (96%) zur Probe pipettiert. Anschließend wurden die Proben behandelt wie die vorgenannten Gewebeproben. Nach Analyse des DNA Gehalts der Proben pro µl wurde der zusätzlich benötigte Puffer AE errechnet und die Probe mit dem Puffer so verdünnt, dass die Werte 100 ng DNA pro µl für KM und 4 ng / µl DNA für die Blutproben erreicht wurden. Diese verdünnten Proben wurden für die Quantifiler Real-Time-PCR eingesetzt.

2.2.1.21 Methoden zur Pharmakokinetik

2.2.1.22 Detektion humaner DNA durch quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Quantifiler PCR von ABI detektiert ein humanspezifisches “One-copy-target” Gen, das 62 Basen lange Human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). Wenn in der Real-Time-PCR ein Signal für die Detektion dieses Gens entsteht, bedeutet dies die Anwesenheit humaner DNA in der Maus, da die Maus nicht über dieses Gen verfügt. Das hTERT kommt pro menschlicher Zelle nur einmal vor, weshalb das Signal durch eine Standardreihe quantitativ in ng DNA und dann in menschliche Zellen umgewandelt werden kann. Für den Ansatz wurden die Proben mit 4ng DNA/µl für Blut DNA bzw. mit 100 ng/µl KM DNA und 300 ng/µl Gewebe DNA eingesetzt. Die humane DNA Standards wurden mit T₁₀E_{0.1} Puffer hergestellt. Die Standardverdünnungsreihe wurde folgendermaßen pipettiert:

Tab. 18: Standard Verdünnungsreihe PCR

Standard	Konzentration (ng/µl)	Mengen	Minimalmenge	Verdünnungsfaktor
Std. 1	50.000	50 µl [200 ng/µl stock] + 150 µl T ₁₀ E _{0.1} Puffer	10 µl [200 ng/µl stock] + 30 µl T ₁₀ E _{0.1} Puffer	4 ×
Std. 2	16.700	50 µl [Std. 1] + 100 µl T ₁₀ E _{0.1} Puffer	10 µl [Std. 1] + 20 µl T ₁₀ E _{0.1} Puffer	3 ×

Std. 3	5.560	50 µl [Std. 2] + 100 µl T ₁₀ E _{0.1} Puffer	10 µl [Std. 2] + 20 µl T ₁₀ E _{0.1} Puffer	3 ×
Std. 4	1.850	50 µl [Std. 3] + 100 µl T ₁₀ E _{0.1} Puffer	10 µl [Std. 3] + 20 µl T ₁₀ E _{0.1} Puffer	3 ×
Std. 5	0.620	50 µl [Std. 4] + 100 µl T ₁₀ E _{0.1} Puffer	10 µl [Std. 4] + 20 µl T ₁₀ E _{0.1} Puffer	3 ×
Std. 6	0.210	50 µl [Std. 5] + 100 µl T ₁₀ E _{0.1} Puffer	10 µl [Std. 5] + 20 µl T ₁₀ E _{0.1} Puffer	3 ×
Std. 7	0.068	50 µl [Std. 6] + 100 µl T ₁₀ E _{0.1} Puffer	10 µl [Std. 6] + 20 µl T ₁₀ E _{0.1} Puffer	3 ×
Std. 8	0.023	50 µl [Std. 7] + 100 µl T ₁₀ E _{0.1} Puffer	10 µl [Std. 7] + 20 µl T ₁₀ E _{0.1} Puffer	3 ×

Der Primer wurde vor dem Pipettieren langsam aufgetaut und anschließend auf Eis aufbewahrt. Vor dem Öffnen wurde 3-5 Sekunden gevortext. Der PCR Reaction Mix wurde kurz geschwenkt und ebenfalls auf Eis gestellt. Pro Ansatz wurden 10,5 µl Primer Mix und 12,5 µl Reaction Mix zusammen pipettiert und aus diesem Master Mix 23 µl in jedes Well der Light Cycler Platte pipettiert. Anschließend wurden 6 µl DNA-Verdünnung hinzu pipettiert, so dass 29 µl pro Well der Light Cycler Platte gefüllt waren. Jede Probe wurde in doppelter Ausführung auf der Platte angelegt und pro 96 Well Platte wurden alle acht DNA Standards in Duplikaten mit analysiert und zur anschließenden Berechnung der Probenkonzentrationen herangezogen. Waren alle Wells fertig pipettiert, wurde ein "Optical Adhesive Cover" (eine dünne Plastikfolie als Verdampfungsschutz über die Proben) geklebt und die 96 Well Platte für 20 s bei 200g zentrifugiert und in den Light Cycler gestellt. Anschließend wurde folgendes Programm gefahren:

Es wurden 50 Zyklen des Amplifizierens (Annealing) gefahren, siehe Tab. 19:

Tab. 19: Cycler Programm der Quantifiler RT-PCR

Phase	Zyklen	Temperatur (°C)	Dauer
Prä-Inkubation	1	95	10 Minuten
Amplifizierung	50	95	15 Sekunden
		60	60 Sekunden
Kühlen	1	40	1 Sekunde

Nach Beendigung der Real-Time PCR wurden die Ergebnisse mit Hilfe der Light Cycler Software analysiert. Diese errechnet durch eine Standardkurve die Menge an humaner DNA

pro Probe. Laut Ramot²⁸¹ ist pro menschlicher Zelle 6,67 pg DNA vorhanden. Die Ergebnisse der Quantifiler Real-Time-PCR bezogen sich auf die Menge an menschlicher DNA. Diese wurden in humane Zellen umgerechnet sowie in humane Zellen pro Mausorgan, da bekannt war, dass $6 \cdot 4\text{ng}$ (in 2 μl für Blut) Maus DNA pro Well bzw. $6 \cdot 300\text{ ng}$ DNA für Gewebe und $6 \cdot 100\text{ ng}$ DNA für KM pro PCR Probe eingesetzt wurden. Für die Mauszelle wurde mit $7,3\text{ pg}$ Maus DNA²⁸² gerechnet. Die Zellzahlen pro Organ wurden, wenn nicht anders in der Tabelle angegeben, aus Meyerrose et al., 2007 entnommen, siehe Tab. 20.

Tab. 20: Mauszellen pro Organ

Organ	Mauszellen pro Organ (nur DNA-haltige Zellen)
Milz	$7,21 \cdot 10^7$
Pankreas	$3,51 \cdot 10^8$
Nieren	$3,46 \cdot 10^8$
Leber	$7,58 \cdot 10^8$
Lunge	$2,11 \cdot 10^8$
Blut ²⁸³	Balb/c: $1,7 \cdot 10^6$ NOD: $5,82 \cdot 10^5$
Knochenmark ²⁸⁴	$556 \cdot 10^6$

2.2.1.23 Rare Cell Analyse

Die primären humanen MSCs (hMSCs) wurden mit einem lipophilen fluoreszierenden Carbocyanin Membranfarbstoff (DiI18(5)= „DID“ für die NIRF-Gruppen und DiOC18(3) = „SP-DIO“ für die anderen Gruppen markiert. Hierfür wurde 50 μl SP-DIO Farbstofflösung in 10 ml Zellsuspension mit $1 \cdot 10^6$ Zellen für 10 Minuten bei 4°C inkubiert, anschließend gewaschen und die Zellen bis zum Tag des Versuches eingefroren.

Bei Versuchsbeginn wurden die isolierten primären hMSCs in einer Konzentration von jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Maus langsam i.v. in einem Volumen von 200 μl in die Schwanzvene

²⁸¹ Ramot et al., 2009

²⁸² Lee et al., 1984

²⁸³ Das Verhältnis von Blutvolumen zu Gewicht bei Mäusen beträgt 10.35 ml/g (Vácha, 1975). Das Gewicht der hier eingesetzten Balb/c Mäuse war durchschnittlich 18,6 g (SD 1,45) und das der NOD Mäuse 25g (SD 2). Die Menge an Kern- und damit DNA-haltigen weißen Blutzellen pro ml Blut sind nach Jackson Lab für Balb/c Mäuse 8980/ml und für NOD Mäuse 2250/ml.

²⁸⁴ Die Knochenmarkzellularität acht Wochen alter Balb/c Mäuse laut Table 1 in Colvin et al., 2004.

injiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten (5 Minuten bis 6 Wochen nach Injektion) wurde den Mäusen final 500 – 800 µl Blut retroorbital nach Isofluran-Narkose entnommen und auf Eis in dem Heparinröhrchen gelagert bis die Aufbereitung für die RCA Analyse begann.

Das Blut wurde dann in folgenden Arbeitsschritten behandelt: 1) Mehrfach wenden, 2) 1:10 mit Lysepuffer inkubieren, Inkubationszeit: 10 Minuten bei Raumtemperatur, 3) 15 Minuten bei 200g abzentrifugieren, 4) 1. Waschen: Überstand verwerfen, 5) Pellet in 5 ml PBS resuspendieren, 6) 15 Minuten bei 200g abzentrifugieren, 7) Überstand verwerfen, 8) Puffern: Zugabe von ca. 1ml PBS, 9) 15 Minuten bei 200g abzentrifugieren, 10) Slotten: Die ca. 1000 µl mischen, 11) je 50 µl auftropfen auf Objektträger Superfrost, 4 Objektträger pro Ansatz antrocknen lassen, 12) Zugabe von 50µl 1:100 verdünntem Antikörper 13) Drei mal mit PBS spülen 14) eindeckeln mit Mounting Medium und 15) unter dem Mikroskop auswerten.

Die Antikörperfärbungen wurden außerdem auf hMSC Zellsuspensionen (UC, Passage 4), die ohne Mausblut auf Objektträger aufgetropft wurden (50 µl) angewendet. Hierfür wurden UC hMSCs in Passage 4 stimuliert sowie unstimuliert genommen.

2.2.1.24 NIRF

Die Mäuse wurden für ca. 3 Minuten in einer Inhalationskammer verbracht, die mit einer Sauerstoff (100 ml/min) und 5% Isofluranmischung geflutet war. Die so in Anästhesie versetzten Mäuse wurden anschließend mit einer Inhalationsmaske, aus der das Gasgemisch weiter strömte, in das NIRF Gerät der Firma Maestro Imaging System gelegt. Es wurde ein Venenkatheter an die Schwanzvene gesetzt. Anschließend wurde die Videoaufnahme der jeweiligen Maus gestartet. Erst wurde für ca. 20 Sekunden bei Weißlicht gefilmt, anschließend wurde bei 700nm Licht emittiert und die Absorption bei 645nm durch den NIRF Filter gefilmt. Erst wenn im NIRF Bereich gefilmt wurde, wurden der Maus über den Venenkatheter $1 \cdot 10^6$ DID-markierte hMSCs in 200µl PBS injiziert. Die Mäuse wurden jeweils für ca. zwei Minuten gefilmt und anschließend euthanasiert.

3. Ergebnisse

Die experimentellen Arbeiten und die Auswertung der Versuche wurden in dem Zeitraum April 2010 bis August 2013 in den Laborräumen der Firma Roche Diagnostics in Bernried und Penzberg durchgeführt. Die Ergebnisse lassen sich gliedern in die Themengebiete *in vitro* Analyse der Biologie unmarkierter versus markierter MSCs, Versuche zur Wahl des geeigneten Mausmodells (Diabetes Onset) sowie Vergleich der Pharmakokinetik von Wildtyp-Mäusen versus diabetischen Mäusen.

3.1 Charakterisierung der MSC Biologie: fluoreszenzmarkierte und unmarkierte MSCs

3.1.1.1 *In vitro* Übertragbarkeit des SP-DIO Labels von hMSCs auf Mauszellen

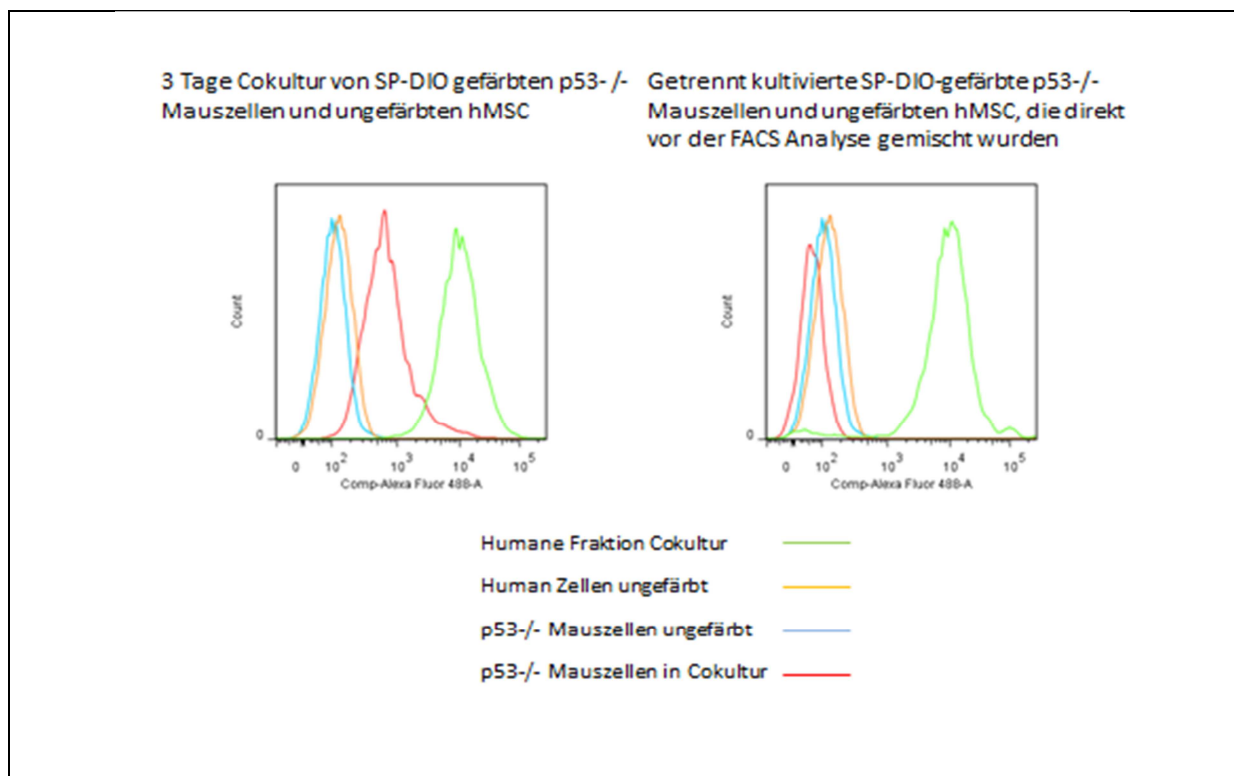


Abbildung 12: SP-DIO ist in einer dreitägigen Kokultur von gefärbten Mauszellen und ungefärbten humanen MSCs im Verhältnis 1:10 übertragbar.

Die Idee der in Abbildung 12 sowie Abbildung 13 dargestellten Versuchsanordnung ist, ein Überblick darüber zu bekommen, ob die SP-DiO gefärbten hMSCs ihren Farbstoff *in vivo* an die Mauszellen abgeben oder teilweise weitergeben können. Hierzu wurde ein *in vitro* FACS-

Versuch durchgeführt, bei dem gefärbte menschliche und ungefärbte Mauszellen gemeinsam kultiviert wurden. Da die Teilungsrate der immortalen p53^{-/-} Mauszelllinie sehr viel höher ist als die der primären hMSCs, wurde für diesen Versuch eine Relation von 1:10 für Maus-Zellen zu Mensch-Zellen ausgesät. Die hMSCs wurden vor der Cokultivierung mit SP-DIO gefärbt. Aus Abbildung 13 ist ersichtlich, dass die humanen Zellen in begrenztem Umfang SP-DIO verlieren, während die Mauszellen „grüner“ leuchten als vor der Cokultivierung.

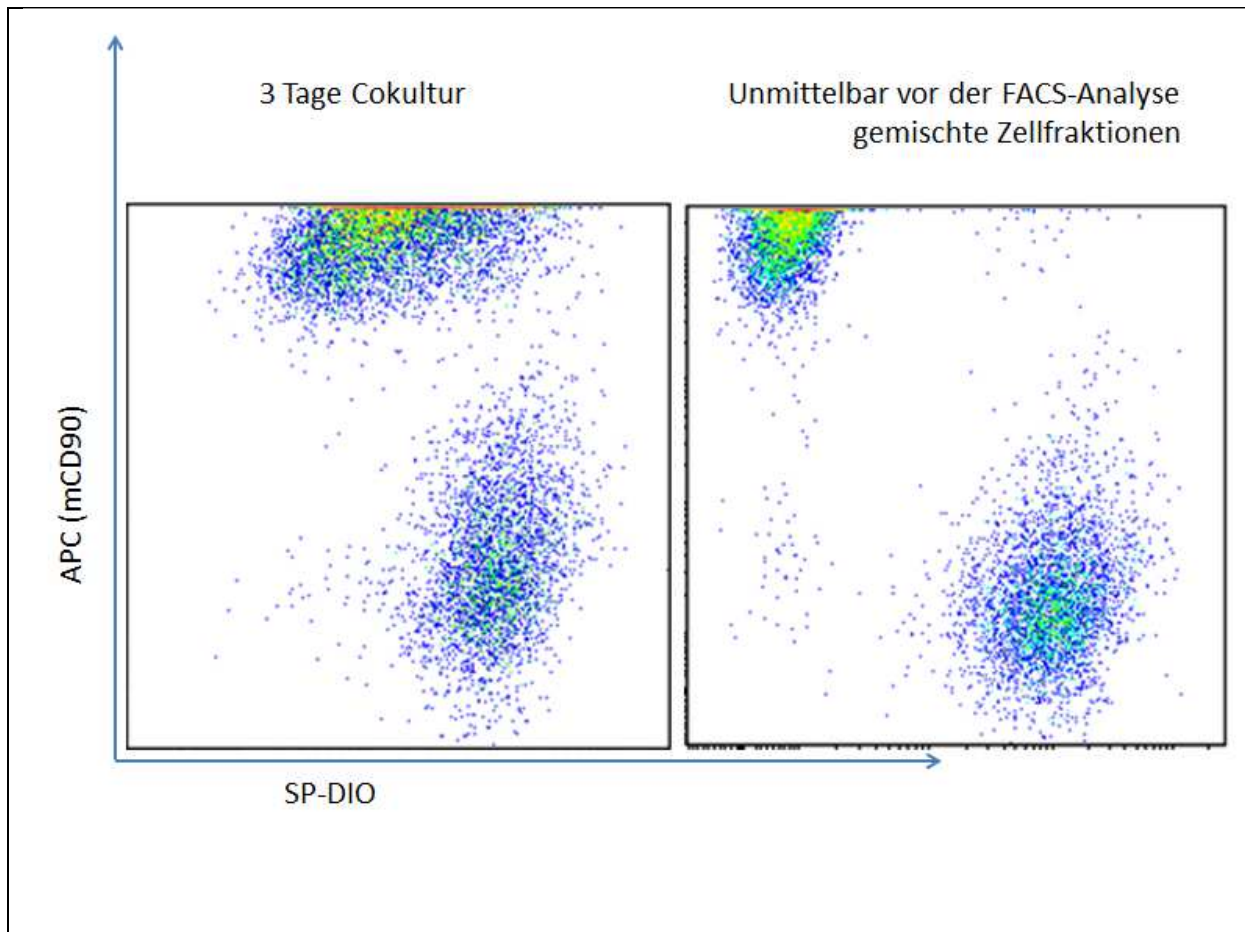


Abbildung 13: In der Cokultur von SP-DIO gefärbten hMSCs mit ungefärbten murinen p53^{-/-} MSCs ist im FACS Experiment eine Übertragung von SP-DIO zwischen den Zelltypen sichtbar.

Relevanz des Cokultur-Versuchs für die Tierversuche

Der Farbstoff SP-DIO war in einem dreitägigen Cokultur-Versuch von Mensch- auf Maus-Zellen übertragbar. Dies bedeutet jedoch nicht, dass die Mauszellen, nachdem der Maus SP-DIO gefärbte hMSCs injiziert wurden, grün fluoreszieren. Man kann aber davon ausgehen, dass die hMSCs *in vivo* über die Zeit viel an Leuchtkraft verlieren werden.

Da in dem Versuch die Relation von Maus-Zellen zu Mensch-Zellen 1:10 betrug, sind die ungefärbten Maus-Zellen von einer erheblichen Zahl gefärbter Mensch-Zellen umgeben. Dieses Verhältnis von Maus-Zellen zu den sie umgebenden Mensch-Zellen in der *in vitro* Situation ist in der *in vivo* Situation stärker als nur umgekehrt proportional.

3.1.1.2 Haltbarkeit der SP-DIO-Markierung in hMSCs

Membranfluoreszenzfarbstoffe „verdünnen“ sich bei Zellteilungen, da die jeweilige Tochterzelle nur ca. 50% der gefärbten Membran und demnach auch der Fluoreszenz erhält. Damit man einen Einblick darüber bekommt, wie lange der Membranfluoreszenzfarbstoff SP-DIO nach Injektion in eine Maus *in vivo* in intakten, gefärbten hMSCs detektierbar sein kann, wurde *in vitro* ermittelt, wie lange SP-DIO in sich teilenden als auch in sich nicht teilenden Zellen per FACS Analyse detektierbar ist. Damit Zellteilungen ausgeschlossen sind, wurden die SP-DIO gefärbten hMSCs der sich nicht teilenden Gruppe vor der Färbung mit Mitomycin-C behandelt (50µg/mL). In Abbildung 14 sieht man die Ergebnisse dieses FACS Experiments. Die rote Kurve zeigt die Ergebnisse der nicht gefärbten, teilungsfähigen MSCs. Die blaue Kurve zeigt die Ergebnisse der SP-DIO gefärbten, teilungsfähigen MSCs und die gelbe Kurve zeigt die Ergebnisse der SP-DIO gefärbten, nicht teilungsfähigen, Mitomycin-C behandelten MSCs. Bis zu Tag 9 in Kultur sind die teilungsfähigen SP-DIO gefärbten MSCs gut sichtbar auf der X-Achse weiter rechts, also weiter im grünen Kanal, so dass sie von den ungefärbten MSCs unterscheidbar sind. Ab Tag 15 sind die SP-DIO gefärbten und die nicht gefärbten MSCs im FACS nicht mehr zu unterscheiden, d.h. die teilungsfähigen hMSCs behalten den Farbstoff SP-DIO für mindestens 9 aber höchstens 14 Tage. Die Fraktion der hMSCs, die sowohl mit SP-DIO als auch mit Mitomycin-C behandelt wurde, behält den Farbstoff zu 90% mindestens bis zu Tag 49. Es ist also davon auszugehen, dass die hMSCs, die in eine Maus injiziert werden, mindestens neun Tage lang fluoreszieren werden.

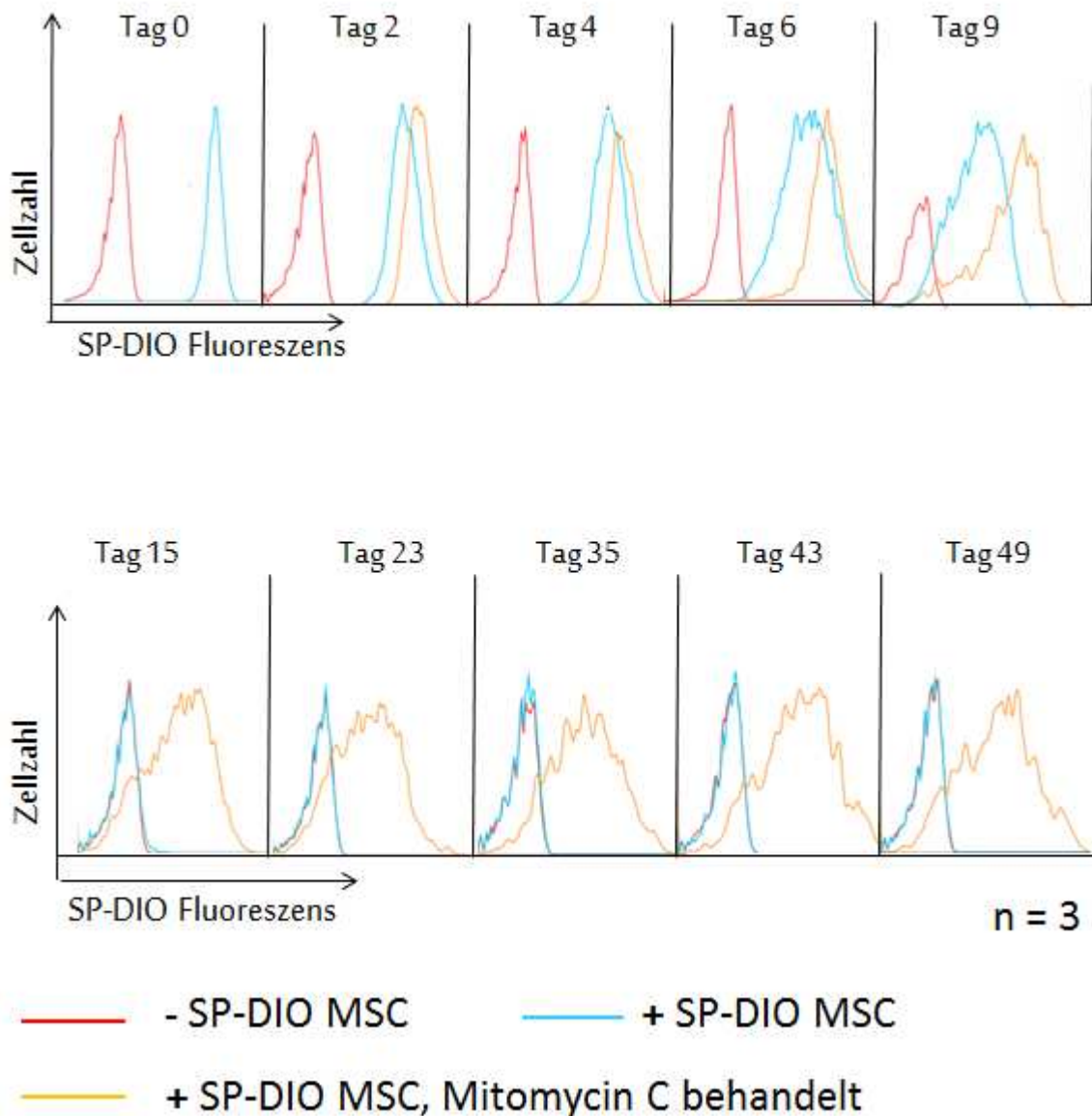


Abbildung 14: SP-DIO Fluoreszenz bleibt in sich teilenden hMSCs in vitro mindestens 9 Tage und in nicht teilenden hMSCs mindestens 49 Tage detektierbar

3.1.1.3 ISCT Kriterien FACS Panel

Bei einem weiteren FACS Versuch sollte geklärt werden, ob der Farbstoff die MSC-Eigenschaften der hUC MSCs verändert. Hierfür wurden die Markerexpression gefärbter und ungefärbter MSCs miteinander verglichen. Antikörper für die positiven ISCT Marker (CD90, CD73, CD105) wurden sowohl mit SP-DIO gefärbten MSCs als auch mit ungefärbten MSCs inkubiert.

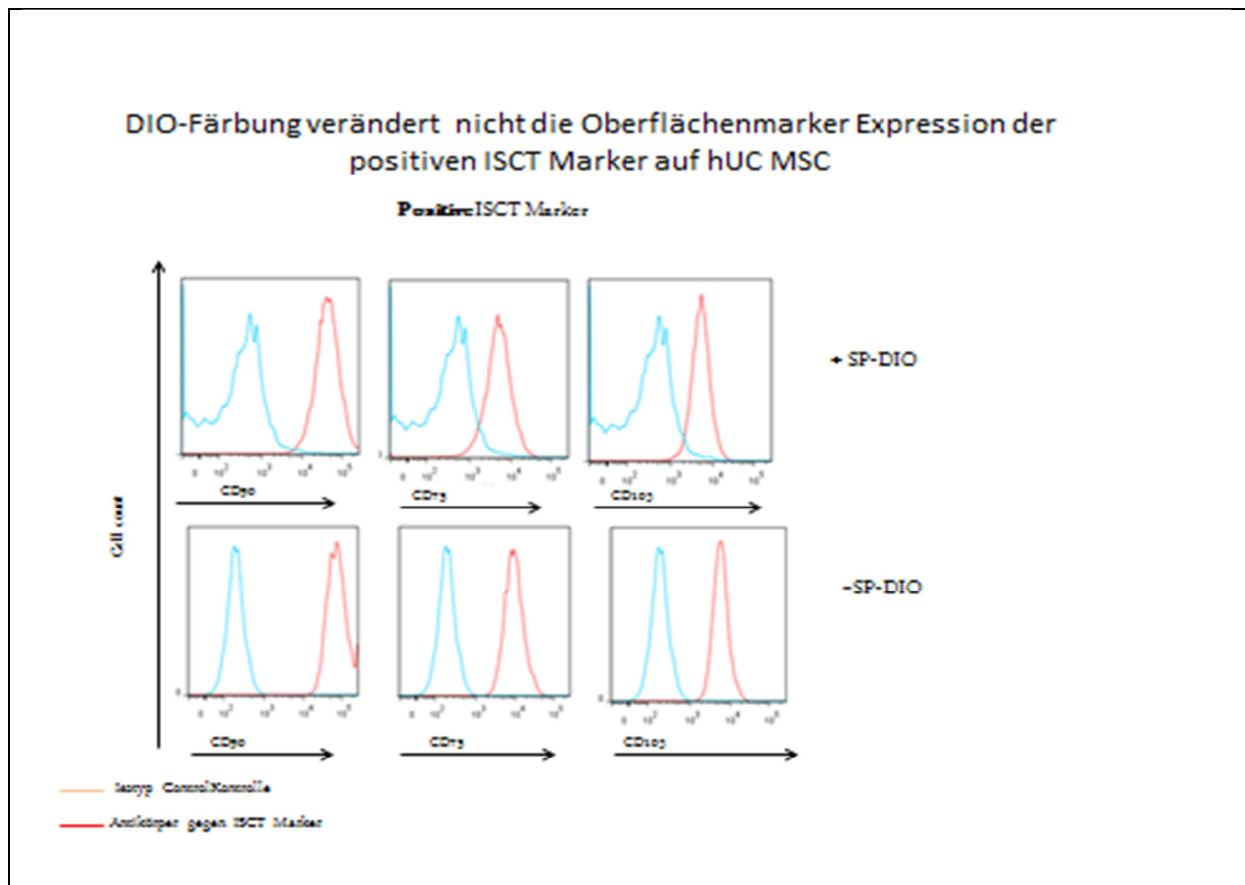


Abbildung 15: Die DIO Färbung verändert nicht die Oberflächenmarker Expression der positiven ISCT Marker auf hUC MSC

Aus der Abbildung 15 ergeben sich keine Hinweise auf eine Veränderung des Phänotyps der gefärbten MSC, da keine unterschiedliche Proteinexpression vorliegt.

In einem nächsten FACS Versuch wurden Antikörper für die negativen ISCT Marker (CD11b, CD14, CD19, CD34, CD45, HLA-DR) sowohl mit SP-DIO gefärbten MSCs als auch mit ungefärbten MSCs inkubiert und diese Zellen anschließend im FACS analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 16 dargestellt.

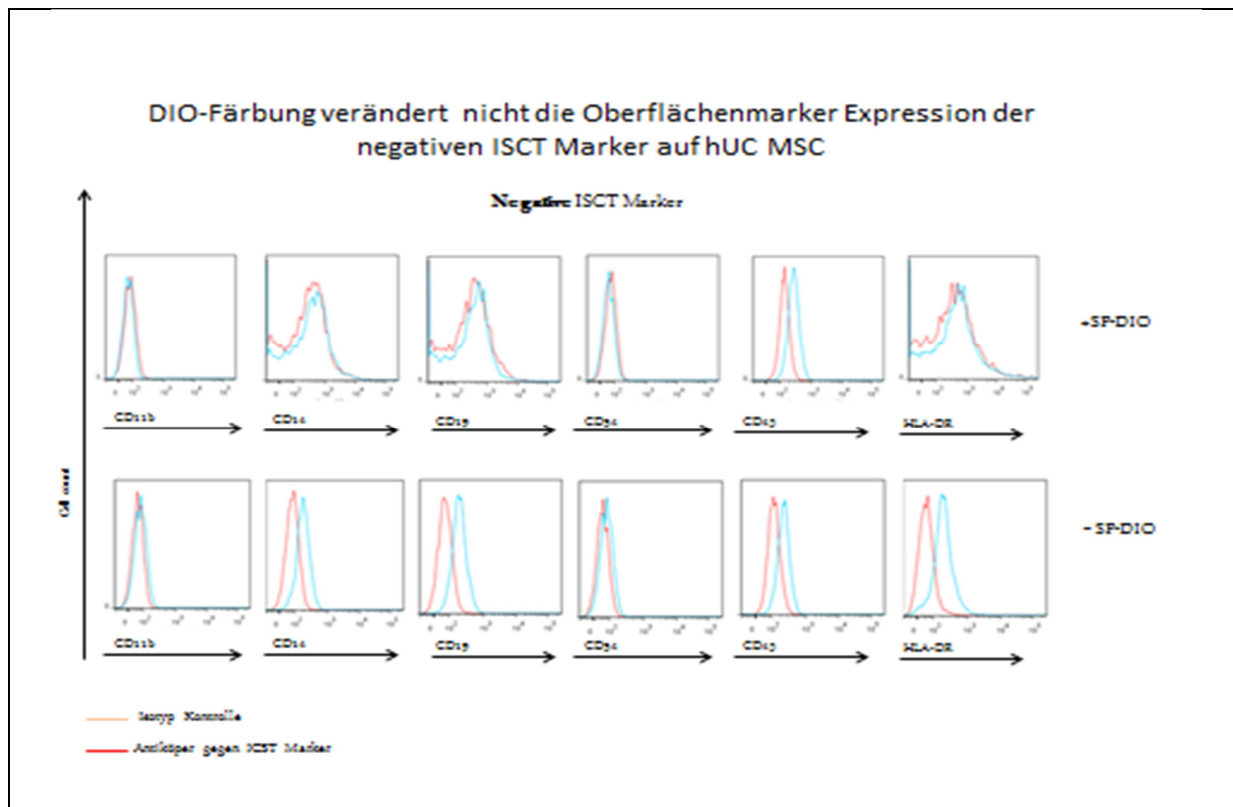


Abbildung 16: DIO verändert nicht die Oberflächenmarker-Expression der negativen ISCT Marker auf hUC MSC

Aus dieser Abbildung 16 ergeben sich ebenfalls keine Hinweise auf eine Veränderung des Phänotyps der gefärbten MSC, da keine unterschiedliche Proteinexpression vorliegt.

Als Ergebnis lässt sich feststellen: Die MSC Biologie hinsichtlich der Proteinexpression von Oberflächenmarkern, die von der ISCT als eines der Merkmale für MSCs definiert ist, ändert sich nicht durch Färbung der Zellen mit SP-DIO.

3.1.1.4 Einfluss von SP-DIO auf die *in vitro* immunmodulatorischen Eigenschaften von MSCs

Um den Einfluss des Farbstoffs SP-DIO auf die immunmodulatorischen Eigenschaften der MSCs *in vitro* zu untersuchen, welche für die Behandlung insbesondere von Autoimmunkrankheiten wie DMT1 wichtig sind, wurde ein PBMC Test gemacht. Hier zeigte sich (siehe Abbildung 17), dass *in vitro* die gefärbten und ungefärbten MSCs sich nicht signifikant in ihrer Fähigkeit unterscheiden, die Proliferation von humanen PBMC zu hemmen.

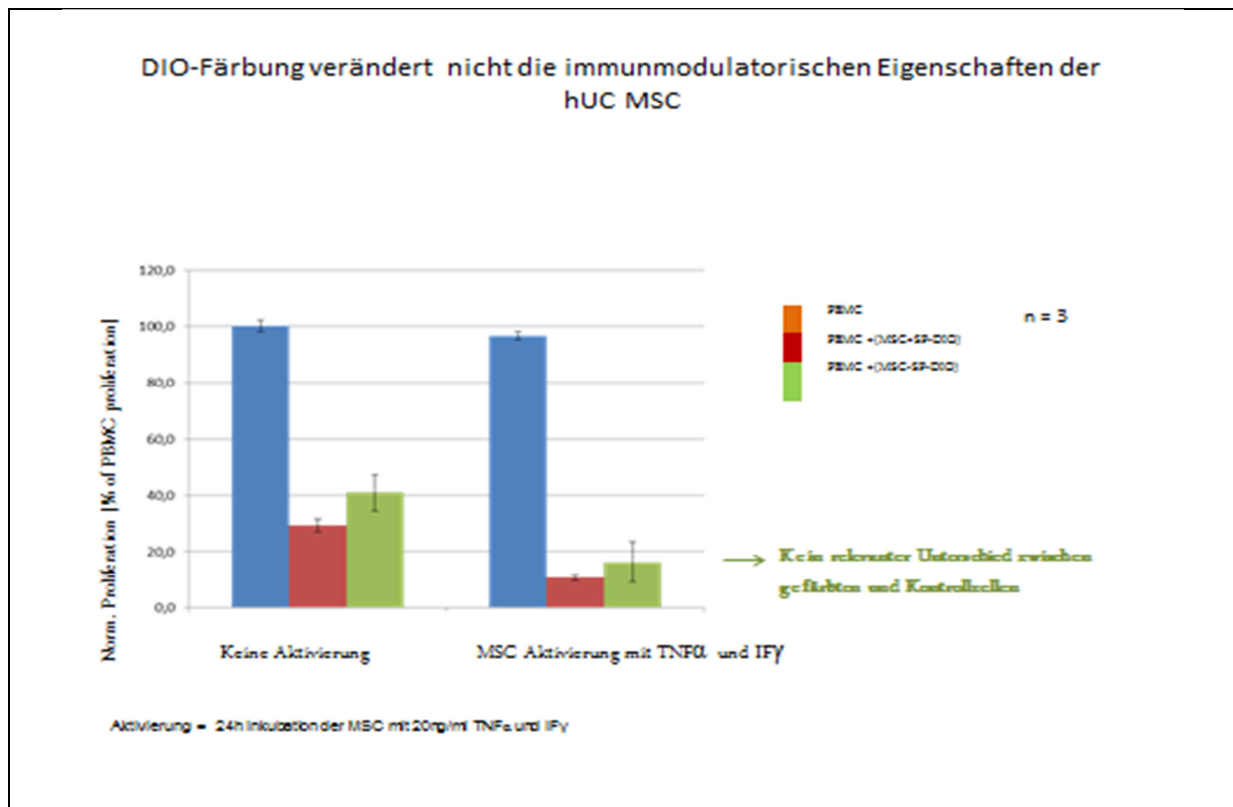


Abbildung 17: die DIO-Färbung verändert nicht die immunmodulatorischen Eigenschaften der hMSC

3.1.1.5 *In vitro* Differenzierung von MSCs

Die Fähigkeit, *in vitro* in Knochen, Knorpel und Fett auszudifferenzieren, ist eines der von der ISCT aufgestellten Merkmale, die zur Definition von MSCs herangezogen werden. Um sicherzustellen, dass dieses fundamentale Charakteristikum der MSCs durch den verwendeten Farbstoff SP-DIO nicht gestört wird, wurden Versuche zur Differenzierung in diese drei mesenchymalen Linien mit hUC MSCs im ungefärbten sowie ungefärbten Zustand *in vitro* durchgeführt.

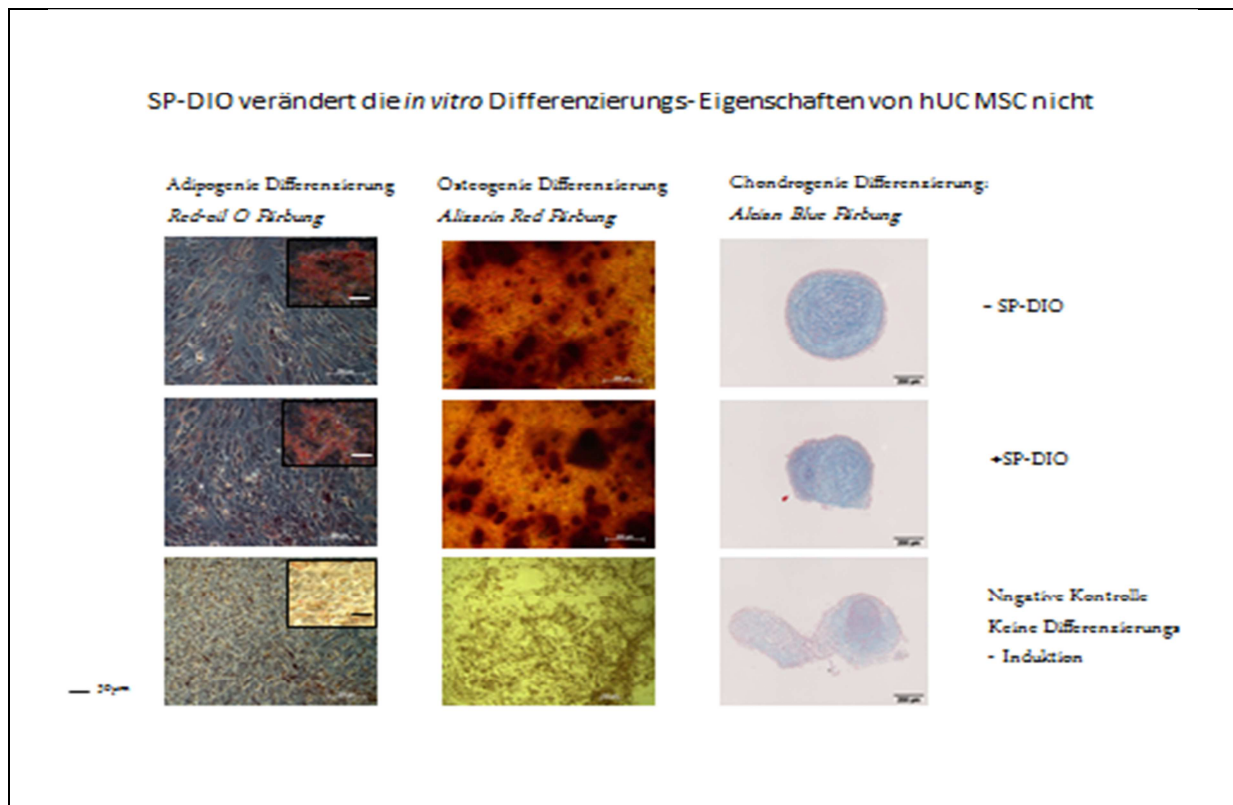


Abbildung 18: Die *in vitro* Differenzierung von SP-DIO gefärbten hUC MSCs und ungefärbten hUC MSCs zeigt in den drei mesenchymalen Linien Fett, Knochen und Knorpel keine Unterschiede

Wie Abbildung 18 zeigt, konnten sowohl gefärbte als auch ungefärbte MSCs in Adipozyten, Osteoblasten und Chondroblasten differenziert werden, während die Zellen der negativen Kontrolle undifferenziert blieben.

3.2 Diabetes Ausbruch (Onset)

Bei jeder der unterschiedlich behandelten Mausgruppen (1a, 1b, 2a, 2b) wurde wöchentlich der Blutglukosestatus bestimmt und ermittelt, ob ein Diabetes mellitus vorliegt. Als Schranke wurde ein Blutglukosewert in der Höhe von 300 mg/dl festgelegt. Wurde dieser Wert zweimal unmittelbar aufeinander folgend überschritten, so wurde die Maus als diabetisch definiert. Diabetische Mäuse wurden aus der Versuchsreihe entfernt.

Für die einzelnen Mausgruppen ergaben sich folgende Ergebnisse.

3.2.1.1 NOD-Mäuse (Gruppe 1a)

Die 50 NOD-Mäuse der Gruppe 1a wurden in der Studie nicht behandelt. Die Versuchsreihe diente dazu, die spontane Diabetes-Inzidenz für NOD-Mäuse zu ermitteln. Nach 32 Lebenswochen waren 58% der Mäuse diabetisch geworden.

Trägt man die Werte der Blutglukosemessungen der Mäuse der Gruppe 1a in Abhängigkeit von dem Lebensalter auf, so erhält man die nachfolgende Graphik. Betrachtet man die Reihe der Medianwerte der Blutglukosemessungen, so befinden diese sich im Bereich von 95,5 mg/dl bis 142 mg/dl.

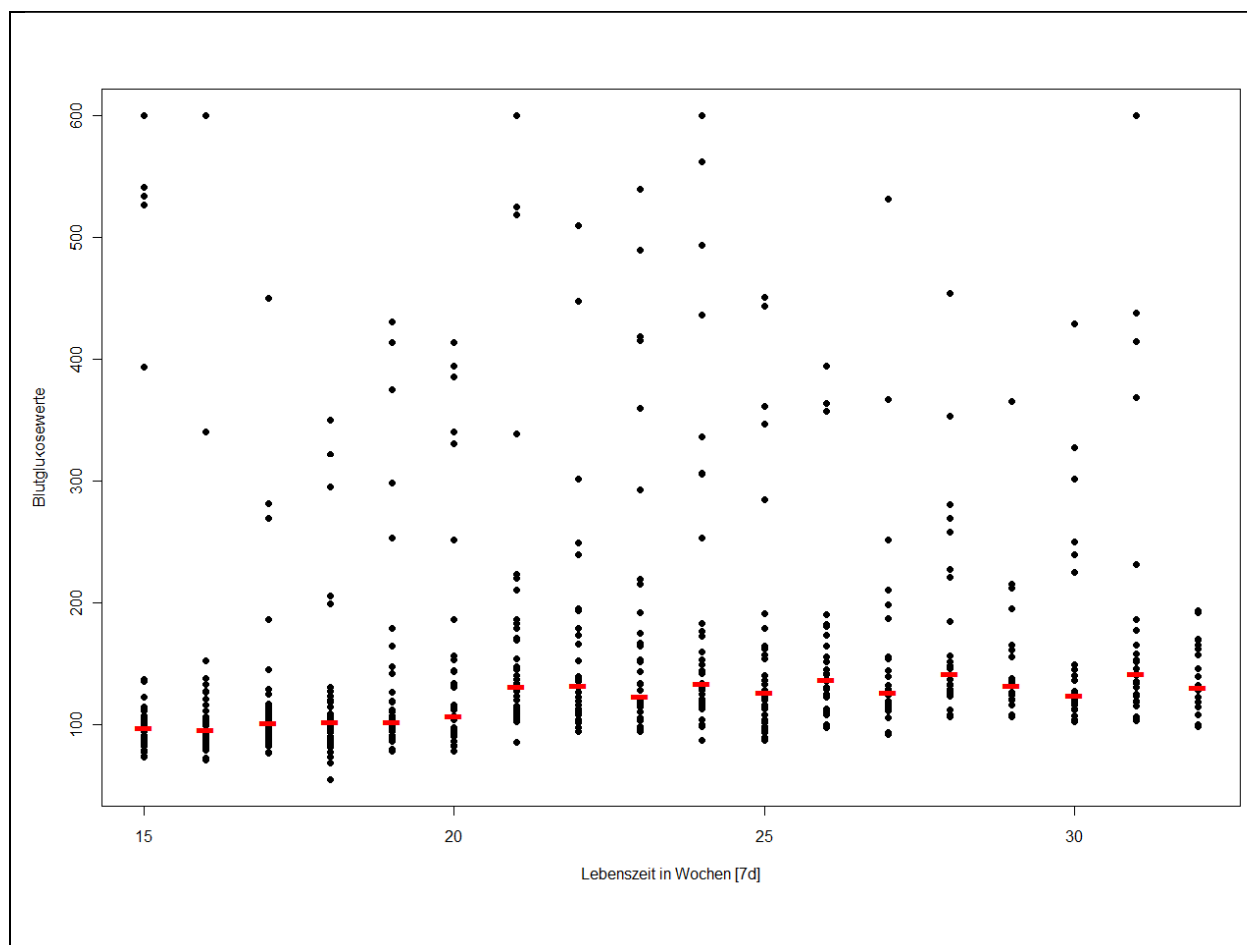


Abbildung 19: Blutglukose Messwerte für die Mäuse der Gruppe 1a

3.2.1.2 NOD-Mäuse mit Cyclophosphamid (Gruppe 1b)

Die 50 NOD-Mäuse der Gruppe 1b wurden in der Studie mit einer einmaligen Gabe von Cyclophosphamid 200 mg/kg i.p. behandelt. Die Versuchsreihe diente dazu, die Diabetes-Inzidenz nach Cyclophosphamid-Gabe für NOD-Mäuse zu bestimmen. Nach 25 Lebenswochen waren 12% der Tiere diabetisch.

Die Werte der Blutglukosemessungen der Mäuse der Gruppe 1b in Abhängigkeit von dem Lebensalter sind in der nachfolgenden Graphik dargestellt. Die Reihe der Medianwerte der Blutglukosemessungen befinden sich im Bereich von 82,5 mg/dl bis 121 mg/dl.

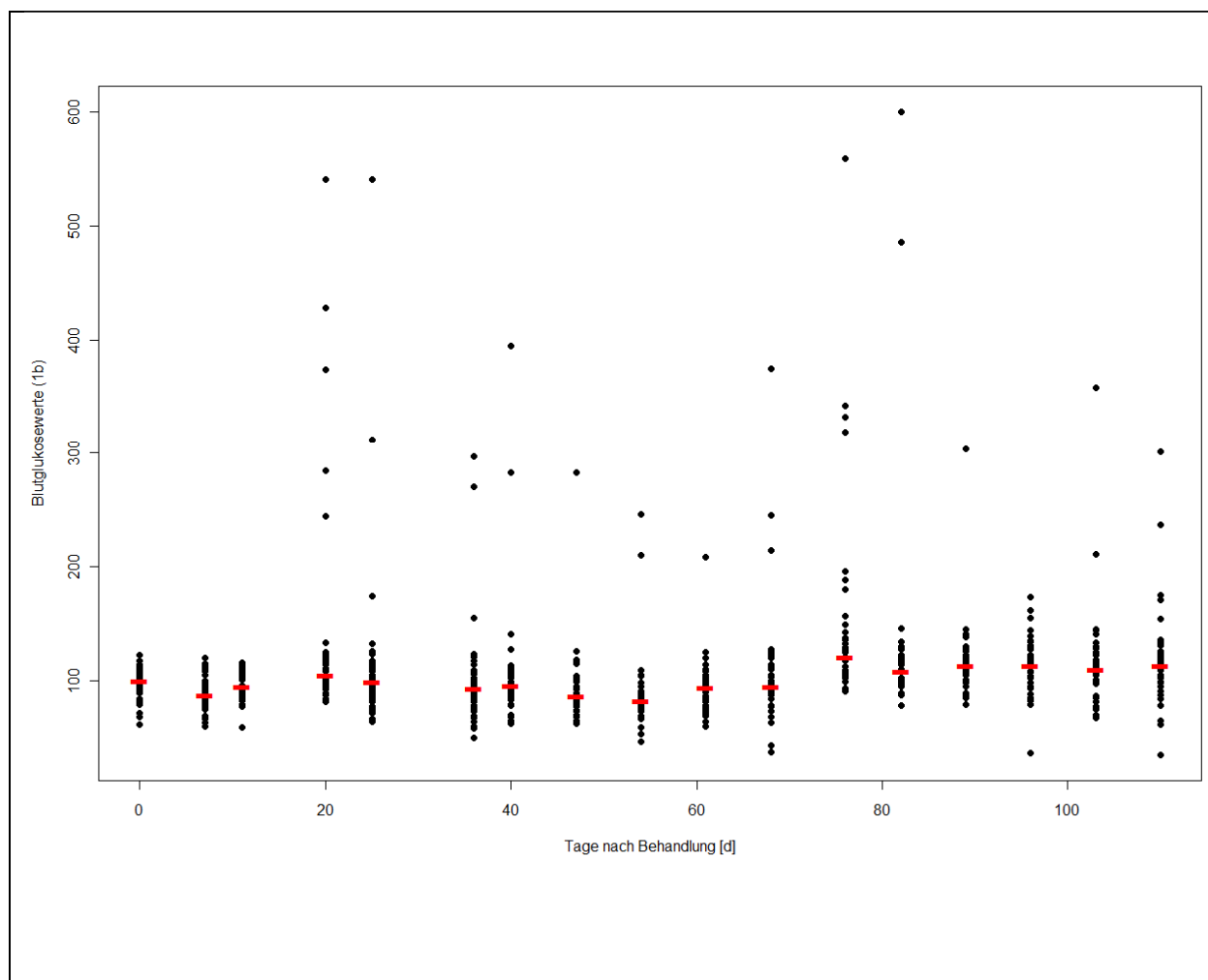


Abbildung 20: Blutglukose Messwerte für die Mäuse der Gruppe 1b

3.2.1.3 Balb/c - Mäuse (Gruppe 2a)

Es wurde 50 Balb/c Mäusen an 5 aufeinanderfolgenden Tagen i.p. Streptozotocin in einer Dosierung von 40 mg/kg gespritzt. Während des Beobachtungszeitraums von 122 Tagen nach Behandlung wurde keine der Mäuse der Gruppe 2a diabetisch. Die Mediane der Blutglukosewerte variieren in dem Intervall von 87 mg/dl bis 140 mg/dl.

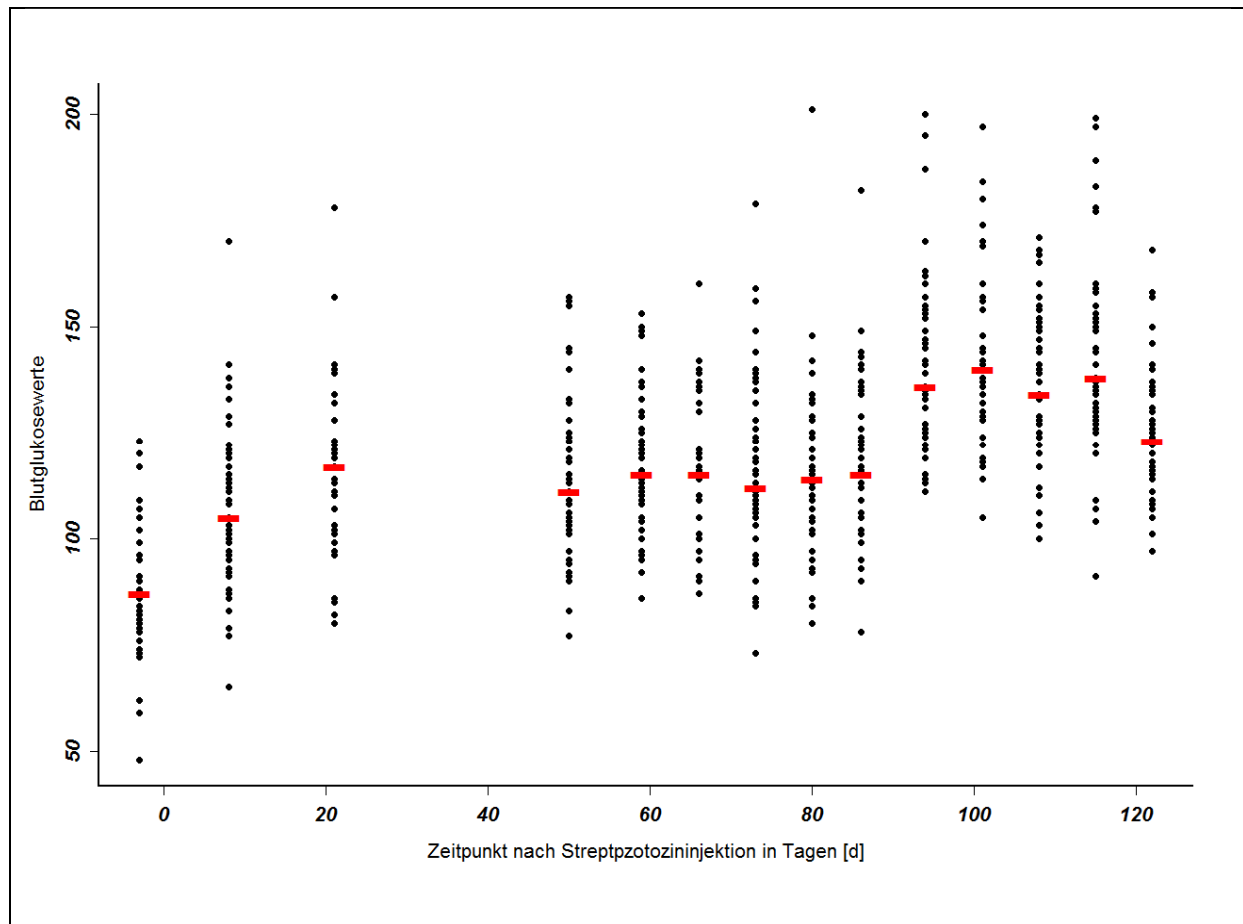


Abbildung 21: Blutglukose Messwerte für die Mäuse der Gruppe 2a

3.2.1.4 Balb/c – Mäuse (Gruppe 2b)

Die Tiere der Gruppe 2b, bestehend aus 50 Balb/c Mäusen, erhielten zusätzlich zur einmaligen Streptozotocin-Gabe von 100 mg/kg eine fetthaltige Diät. Während des Beobachtungszeitraums von 99 Tagen nach Behandlung wurde keine der Mäuse der Gruppe 2b diabetisch.

Die Mediane der Blutglukosemessungen der Mäuse der Gruppe 2b liegen im Bereich zwischen 95 mg/dl und 141 mg/dl.

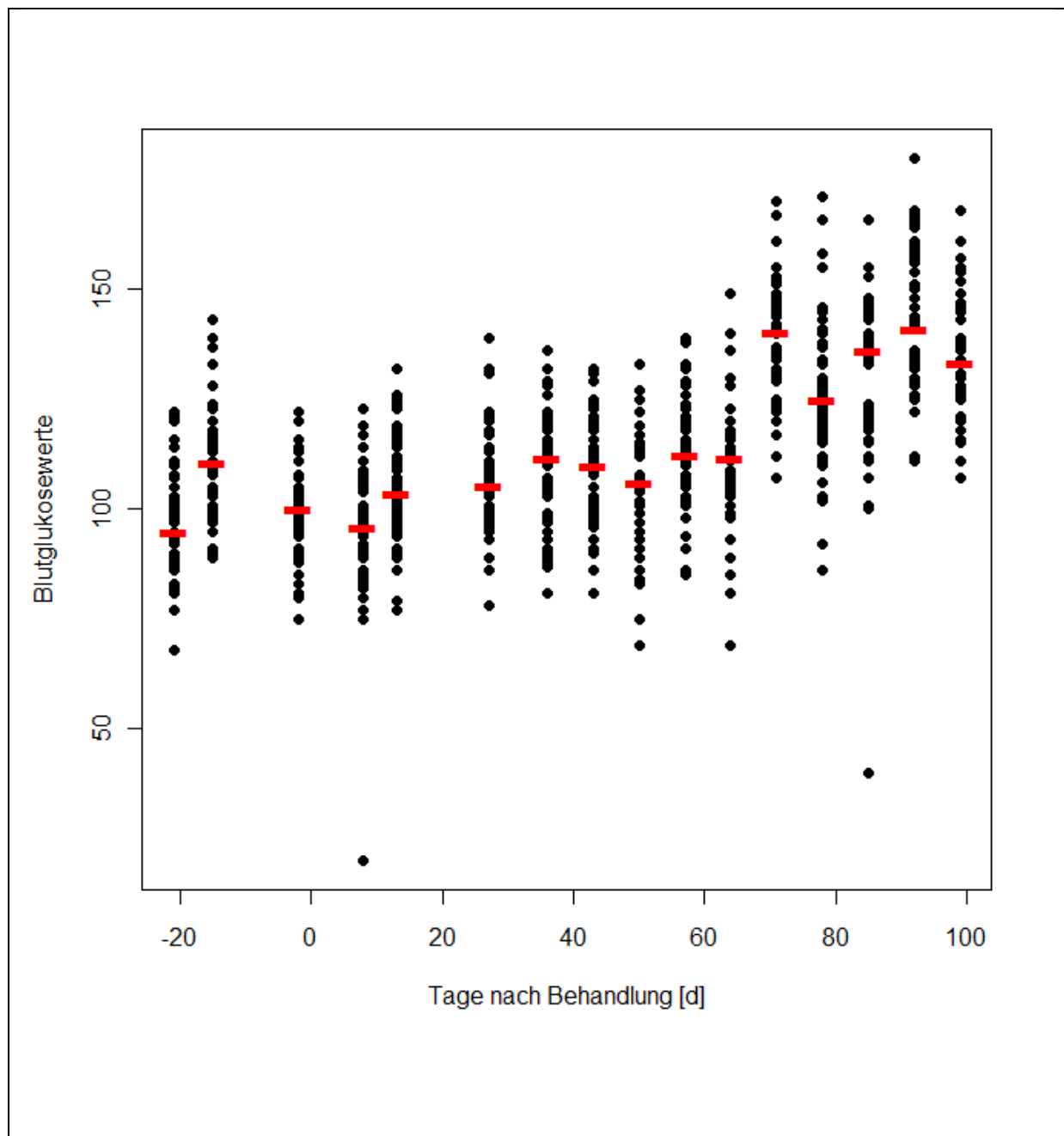


Abbildung 22: Blutglukose Messwerte für die Mäuse der Gruppe 2b

3.2.1.5 Vergleich der Gruppen 1a („NOD Mäuse unbehandelt“) und 1b („NOD Mäuse mit Cyclophosphamid-Injektion“)

Um den Einfluss von einer einmaligen Cyclophosphamid-Gabe auf den Ausbruch von Diabetes mellitus bei NOD-Mäusen zu ermitteln, wurde eine „Überlebenszeitanalyse“ durchgeführt, wobei anstelle der Lebenszeit der Mäuse die Ereigniszeit betrachtet wird, bei der die Mäuse zweimal hintereinander einen Glukosewert von 300 mg/dl überschritten haben.

Betrachtet man für dieses Ereignis eine „Überlebensfunktion“ $S(t)$, so ist diese definiert als die Anzahl der Mäuse in der Gruppe, für die bis zum Zeitpunkt t das Ereignis noch nicht eingetreten ist, dividiert durch die Anzahl der Mäuse dieser Gruppe. Die Überlebensfunktion wird mit Hilfe der Kaplan-Meier-Schätzung ermittelt.²⁸⁵ Trägt man diesen Anteil $S(t)$ für die Gruppen 1a und 1b auf, so ergeben sich für diese Daten folgende Schätzungen der „Überlebensfunktion“ und der dazugehörigen 95% Konfidenzintervalle (KI):

²⁸⁵ Die Berechnungen erfolgten nach Sachs u. Hedderich 2006:611-616.

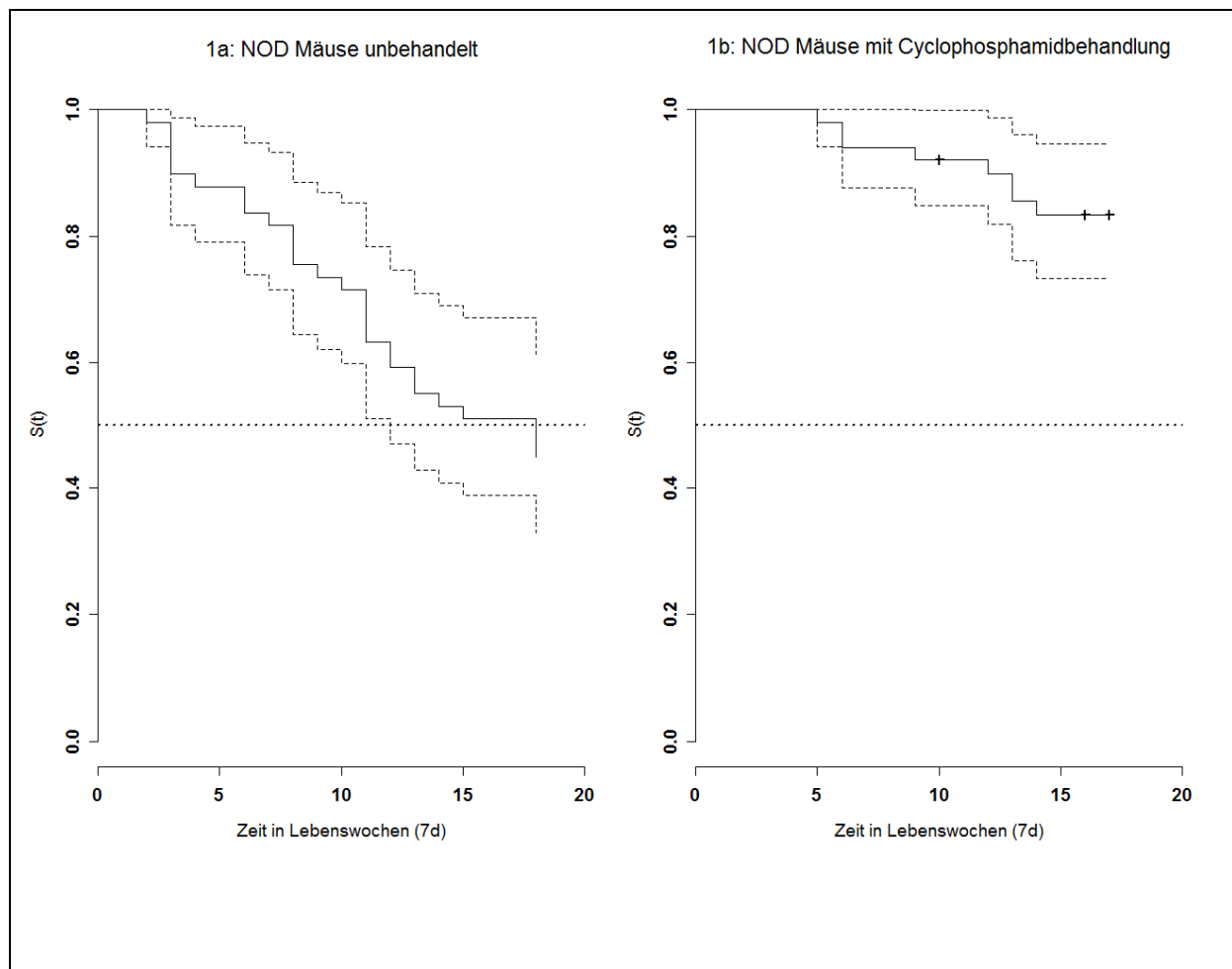


Abbildung 23: Schätzung der „Überlebensfunktion“ (nicht-Diabetes-Inzidenz)
für die Mäuse der Gruppen 1a und 1b

Die 95%-Konfidenzintervalle für die „Überlebensfunktionen“ in Abhängigkeit von den Eintrittszeitpunkten sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 21: Schätzwerte der „Überlebensfunktion“ nach Kaplan-Meier für die Mäuse der Gruppen 1a und 1b

	Zeit	Unteres Risiko	Ereignis	„Überleben“	Standardfehler	unteres 95% KI	oberes 95% KI
Gruppe 1a	2	49	1	0.980	0.0202	0.941	1.000
Gruppe 1a	3	48	4	0.898	0.0432	0.817	0.987
Gruppe 1a	4	44	1	0.878	0.0468	0.790	0.974
Gruppe 1a	6	43	2	0.837	0.0528	0.739	0.947
Gruppe 1a	7	41	1	0.816	0.0553	0.715	0.932
Gruppe 1a	8	40	3	0.755	0.0614	0.644	0.886
Gruppe 1a	9	37	1	0.735	0.0631	0.621	0.869
Gruppe 1a	10	36	1	0.714	0.0645	0.598	0.853
Gruppe 1a	11	35	4	0.633	0.0689	0.511	0.783

Gruppe 1a	12	31	2	0.592	0.0702	0.469	0.747
Gruppe 1a	13	29	2	0.551	0.0711	0.428	0.709
Gruppe 1a	14	27	1	0.531	0.0713	0.408	0.690
Gruppe 1a	15	26	1	0.510	0.0714	0.388	0.671
Gruppe 1a	18	25	3	0.449	0.0711	0.329	0.612
Gruppe 1b	5	50	1	0.980	0.0198	0.942	1.000
Gruppe 1b	6	49	2	0.940	0.0336	0.876	1.000
Gruppe 1b	9	47	1	0.920	0.0384	0.848	0.998
Gruppe 1b	12	43	1	0.899	0.0430	0.818	0.987
Gruppe 1b	13	41	2	0.855	0.0509	0.761	0.961
Gruppe 1b	14	39	1	0.833	0.0541	0.733	0.946

Um den Vergleich der „Überlebenszeiten“ der beiden NOD-Maus Gruppen daraufhin zu untersuchen, ob es einen signifikanten Unterschied in den ihnen zugrunde liegenden Gesamtheiten gibt, wurde der Logrank-Test nach Mantel und Haenszel durchgeführt.²⁸⁶ Die Ergebnisse sind in der nachstehenden Tabelle wiedergegeben. Wie man an dem dort angegebenen kleinen p-Wert erkennt, sind die Unterschiede statistisch hoch signifikant ($p=0,00051$).

Tab. 22: Logrank-Test für die „Überlebensfunktion“ der Mäuse der Gruppen 1a und 1b

	Anzahl	Beobachtet	Erwartet		
	N	O	E	$(O-E)^2/E$	$(O-E)^2/V$
Gruppe 1a	49	27	17.4	5.36	12.1
Gruppe 1b	50	8	17.6	5.27	12.1
Chi-Quadrat = 12.1 bei 1 Freiheitsgrad $p= 0.00051$					

Als Ergebnis für die NOD-Maus Gruppen lässt sich feststellen, dass eine einmalige Cyclophosphamid-Gabe den Diabetes Onset weder beschleunigt noch die Diabetes Gesamt-Inzidenz erhöht. Dieses Resultat bedeutet, dass das Cyclophosphamid- NOD-Mausmodell nicht für die weiteren Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit geeignet ist.

3.2.1.6 Zum Vergleich der Gruppen 2a („Balb/c Mäuse mit 5 Injektionen Streptozotozin“) und 2b („Balb/c Mäuse mit 1 Injektion Streptozotozin + Fettdiät“)

Für die Balb/c Mäuse der Gruppen 2a und 2b wurden während des gesamten Untersuchungszeitraums nur Blutglukosewerte unterhalb der Schwelle von 300 mg/dl

²⁸⁶ Die Berechnungen erfolgten nach Sachs u. Hedderich 2006: 616-61

gemessen. Daher ist der Schluss zu ziehen, dass die Behandlung der Balb/c Mäuse mit den verwendeten Konzentrationen an Streptozotocin nicht für die Verwendung als Diabetesmodell geeignet sind. Aufgrund dieses Befundes wurde auf die Verwendung von Balb/c Mäusen als Diabetesmodell in den Zelltherapieversuchen abgesehen.

3.3 Pharmakokinetik von hMSCs in Wildtypmäusen und diabetischen Mäusen

Der Anteil humaner DNA in 1,8 µg Gesamt-DNA aus Organen der Maus wurde mittels quantitativer PCR bestimmt und umgerechnet auf den Wert pro menschlicher Zelle (6,67 pg DNA/ Zelle). Die Ergebnisse wurden mit Hilfe einer Kernregression²⁸⁷ aus den Messdaten, d.h. aus den positiven humanen DNA-Werten erzeugt. Das zugehörige R-Programm berechnet „mit Hilfe lokaler gewichteter robuster Regressionen Ausgleichswerte“.²⁸⁸ Dabei wurde der Glättungsparameter f („smoother span“) für die R-Funktion „lowess“ jeweils dem Datensatz angepasst, wobei für f Werte zwischen 0,45 (schwache Glättung) und 0,9 (starke Glättung) gewählt wurden. Die graphischen Darstellungen der Kernregressionen sind in den nachstehenden Abbildungen für die Organe Blut, Lunge, Leber, Milz, Niere, Knochenmark und Pankreas für Balb/c Mäuse in blau und für NOD Mäuse in grün wiedergegeben. Die x-Achse zeigt jeweils den Zeitpunkt nach Injektion im dekadischen Logarithmus an, das heißt 5 Minuten bis 6 Wochen nach Injektion entsprechen -1 bis $3 \cdot \log 10$ [h]. Auf der y-Achse sind die detektierten humanen Zellen pro 250.000 Mauszellen aufgetragen. Blaue Punkte entsprechen einem Messpunkt in einer Wildtyp Maus, grüne Punkte entsprechen einem Messpunkt einer diabetischen Maus. Rote Kringel bedeuten, dass keine humane DNA gefunden werden konnte.

²⁸⁷ Vgl. Behr:2005:69-74

²⁸⁸ Vgl. die Funktion „lowess“ in Behr:2005:73

3.3.1.1 Pharmakokinetik von hMSCs in Mäusen, PCR-Daten

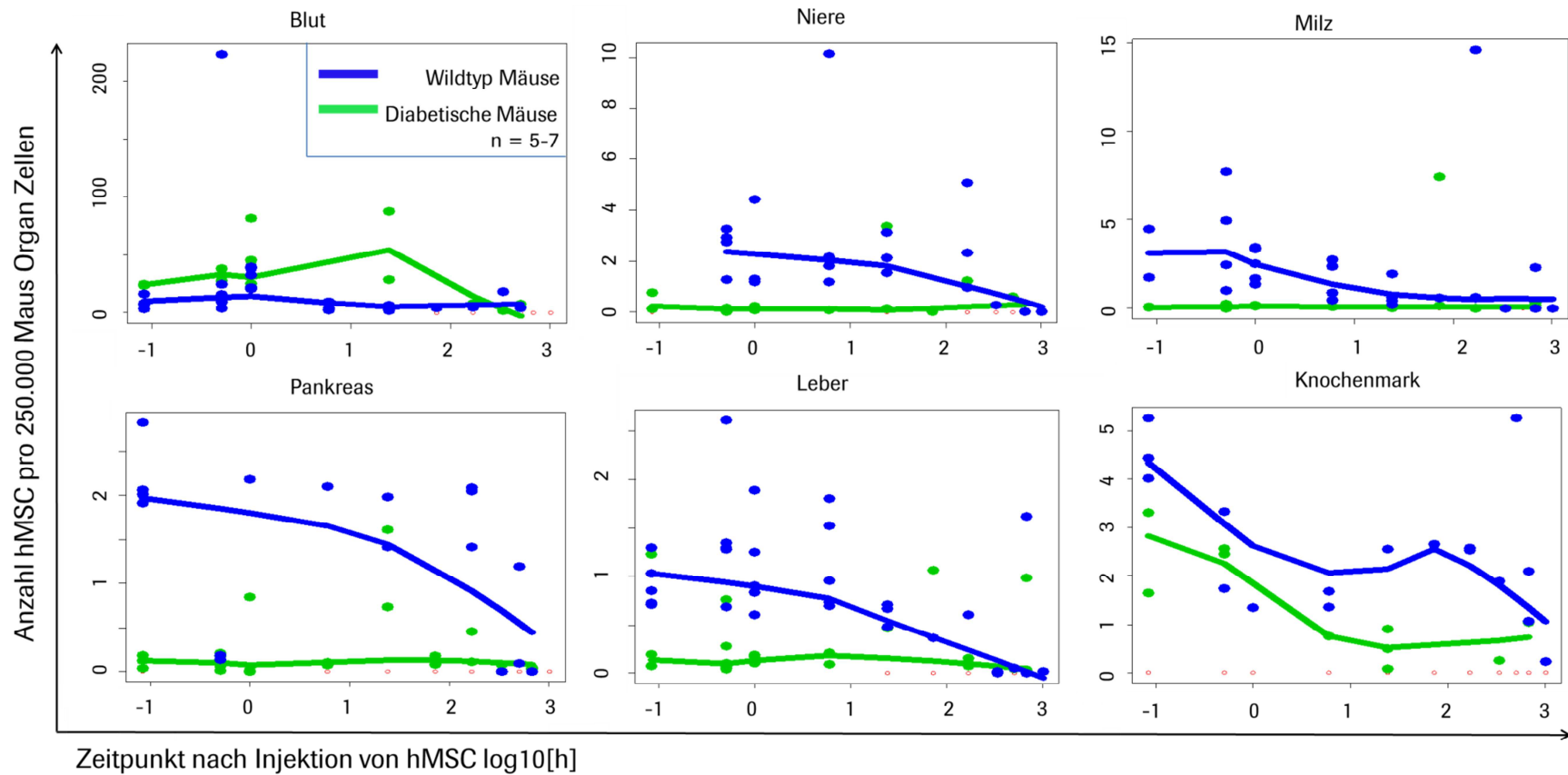


Abbildung 24: Pharmakokinetik der hMSCs pro 250.000 Maus Organ Zellen

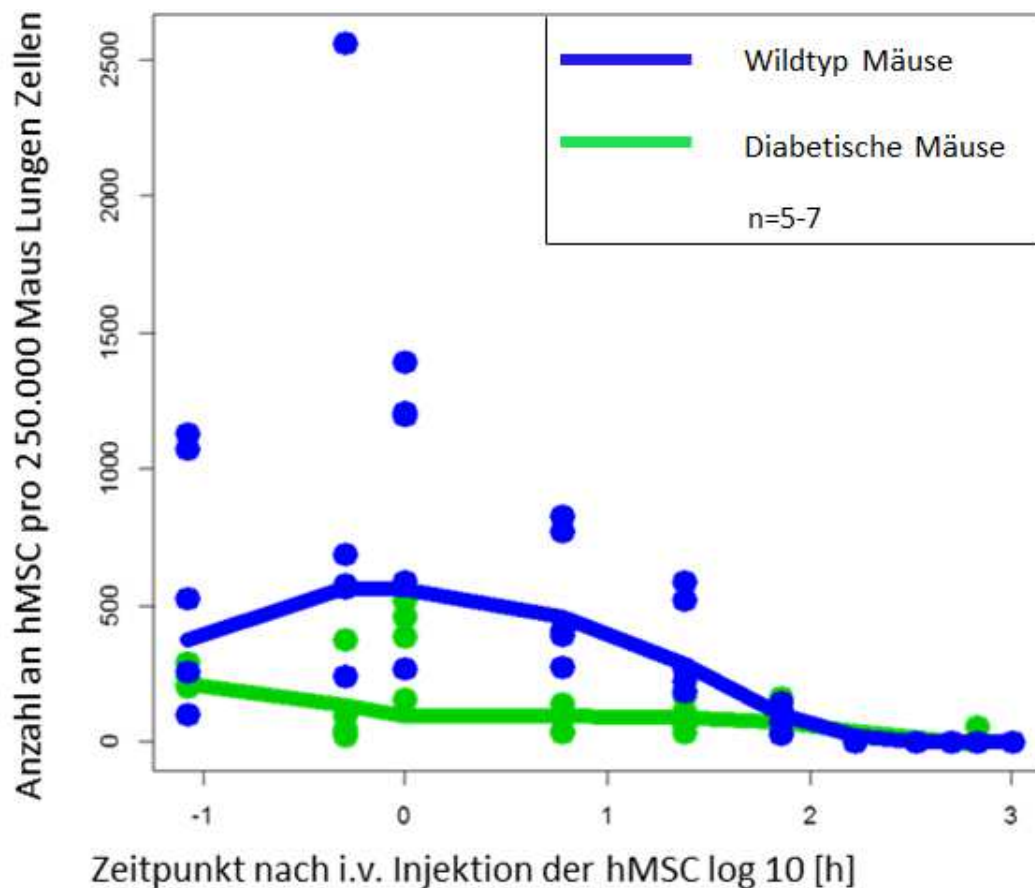


Abbildung 25: Pharmakokinetik der hMSCs pro 250.000 Maus Lungen Zellen

Es wurden pro 250.000 Maus-Organzellen²⁸⁹ in allen Organen, außer Blut und Lunge, weniger als 10 menschliche Zellen nachgewiesen. Nach der Injektion der hMSCs steigt die Anzahl in der ersten Stunde leicht an, anschließend ist die Anzahl der hMSCs rückläufig. Nach sechs Wochen finden sich nur noch sehr geringe Mengen an menschlicher DNA in den Organen der behandelten Mäuse. In der Maus Lunge konnte eine höhere Anzahl an humanen Zellen als in allen anderen Organen gefunden werden, in einer Relation von bis zu 1:100 (humane Zellen: Mauszellen). Der höhere Anteil an hMSCs, die pro 250.000 Maus Organzellen in den Wildtyp im Vergleich zu den diabetischen Mäusen gefunden werden

²⁸⁹ entspricht Anzahl humaner Zellen in jeweils 6 x 300ng Maus DNA, was 246575 Zellen entspricht, gerundet 250.000 Zellen

können, liegt wahrscheinlich an deren niedrigerem Gewicht – die NOD Mäusen wiegen ca. 1,75 mal mehr als die Balb/c Mäuse, so dass sich die hMSCs in mehr Maus-Organzellen verteilen.

Extrapoliert man dieselben Daten pro gesamtem Organ der Maus und korrigiert die NOD Daten um den Faktor des höheren Gewichts, so erhält man die Abbildung 26. Hier ist die Prozentzahl von der Gesamtheit der applizierten Zellen (10^6) als Mediane der Mausgruppen (n=5-7, d.h. 5 bis 7 Mäuse pro Gruppe) aufgelistet. Innerhalb der ersten Stunde nach Injektion kommt es zu einer Akkumulation der Zellen in der Lunge. 70-100% der injizierten Zellen können in den Wildtyp und in den Diabetes Mäusen eine Stunde nach Injektion in der Lunge gefunden werden, danach nimmt ihre Zahl stetig ab. In den anderen Organen finden sich unter 1% der hMSCs wieder.

Verteilung von hMSC in Wildtyp Mäusen (in %)	Zeit	Blut	Niere	Milz	Pankreas	Leber	Knochenmark	Lunge
	5 Minuten	0,1	0,0	0,0	0,3	0,3	0,9	44,3
	30 Minuten	0,1	0,4	0,1	0,0	0,4	0,0	48,8
	60 Minuten	0,3	0,2	0,1	0,0	0,3	0,0	101,3
	6 Stunden	0,1	0,3	0,0	0,0	0,3	0,0	34,5
	24 Stunden	0,0	0,2	0,0	0,0	0,1	0,0	22,5
	72 Stunden	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,4
	1 Woche	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	0,0	0,2
	2 Wochen	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2
	3 Wochen	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Verteilung von hMSC in Diabetes Mäusen (in %)	Zeit	Blut	Niere	Milz	Pankreas	Leber	Knochenmark	Lunge
	5 Minuten	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	35,6
	30 Minuten	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,4
	60 Minuten	0,4	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	67,5
	6 Stunden	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	15,1
	24 Stunden	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	17,0
	72 Stunden	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	12,7
	1 Woche	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	2 Wochen	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	3 Wochen	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4 Wochen	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Abbildung 26: Verteilung der hMSCs in ganzen Organen von Wildtyp und Diabetes Mäusen, angeben in % der ursprünglich injizierte Zellezahl (Median der Gruppe)

Sieht man sich die Mediane der detektierten menschlichen Zellen pro gesamtem Mausorgan an, wird noch klarer, dass die Zellen sich in der Lunge akkumulieren. Der Großteil von 70-100% der hMSCs findet sich später in der Lunge der Mäuse wieder, wobei die Anzahl der

hMSCs mit der Zeit geringer wird bis hin zu 4-6 Wochen nach Injektion, wo im Median keine hMSCs mehr gefunden werden können.

3.3.1.2 Pharmakokinetik von hMSCs in Mäusen

3.3.1.3 RCA Ergebnisse

Die hUC MSCs wurden mit SP-DIO gefärbt und in unbehandeltes Mausblut eingespiket, wobei das Verhältnis 1:100 für Menschzellen: Mausezellen betrug. Anschließend wurde das Blut entsprechend der RCA Versuche behandelt und auf Objektträger fixiert. Es wurden Antikörper gegen die positiven ISCT Marker CD73 und CD90 inkubiert. In Abbildung 27 wurden die hMSCs ohne Mausblut auf Objektträger getropft und mit Hilfe der Immuncytochemie (ICC) deren positiven ISCT Marker CD73 und CD90 gefärbt. In Abbildung 28 wurden die SP-DIO gefärbten hMSCs vorher in Mausblut gemischt und wie in der RCA behandelt: Auch hier sieht man an der Fluoreszenzemission, dass die positiven ISCT Marker erkennbar positiv sind. Wurden die hMSCs vor der ICC immunstimuliert, sind die Proteinexpressionen und damit die Fluoreszenz der Antikörper bei der ICC noch ausgeprägter, siehe Abbildung 29 und Abbildung 30.

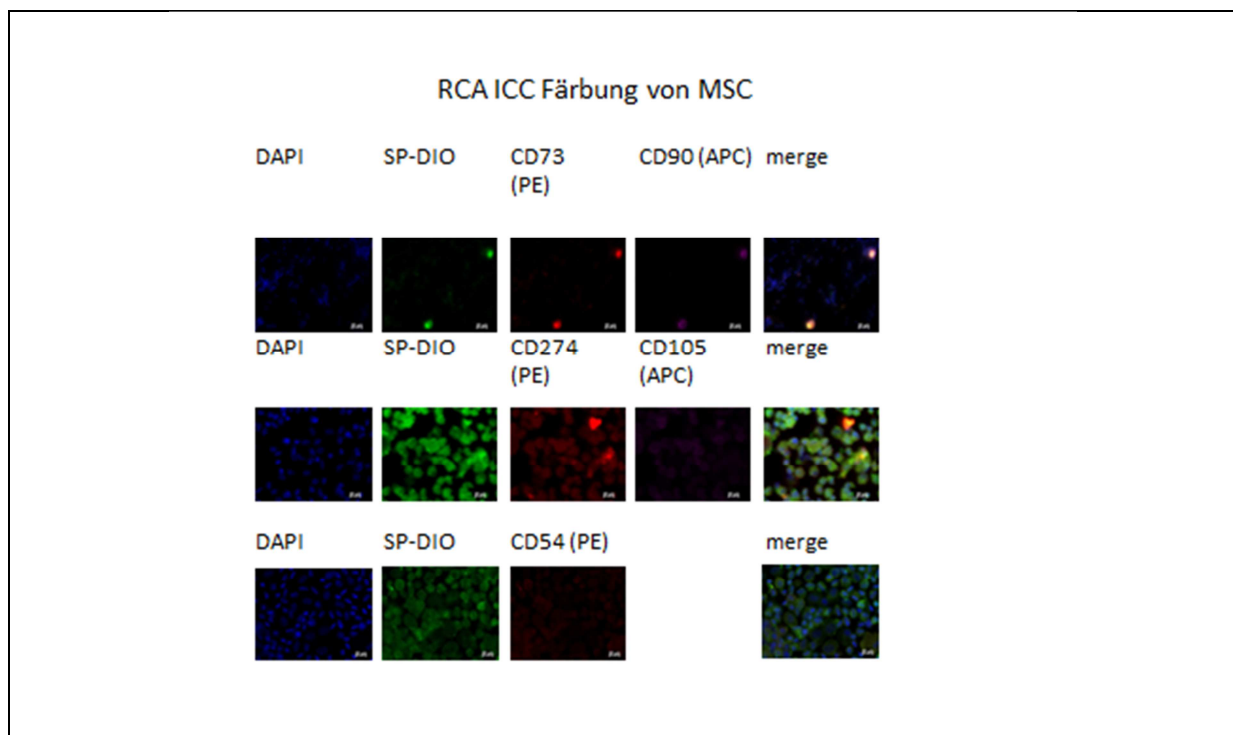


Abbildung 27: SP-DIO gefärbte hUC MSCs zeigen in der ICC die positiven ISCT Marker CD73 und CD90.

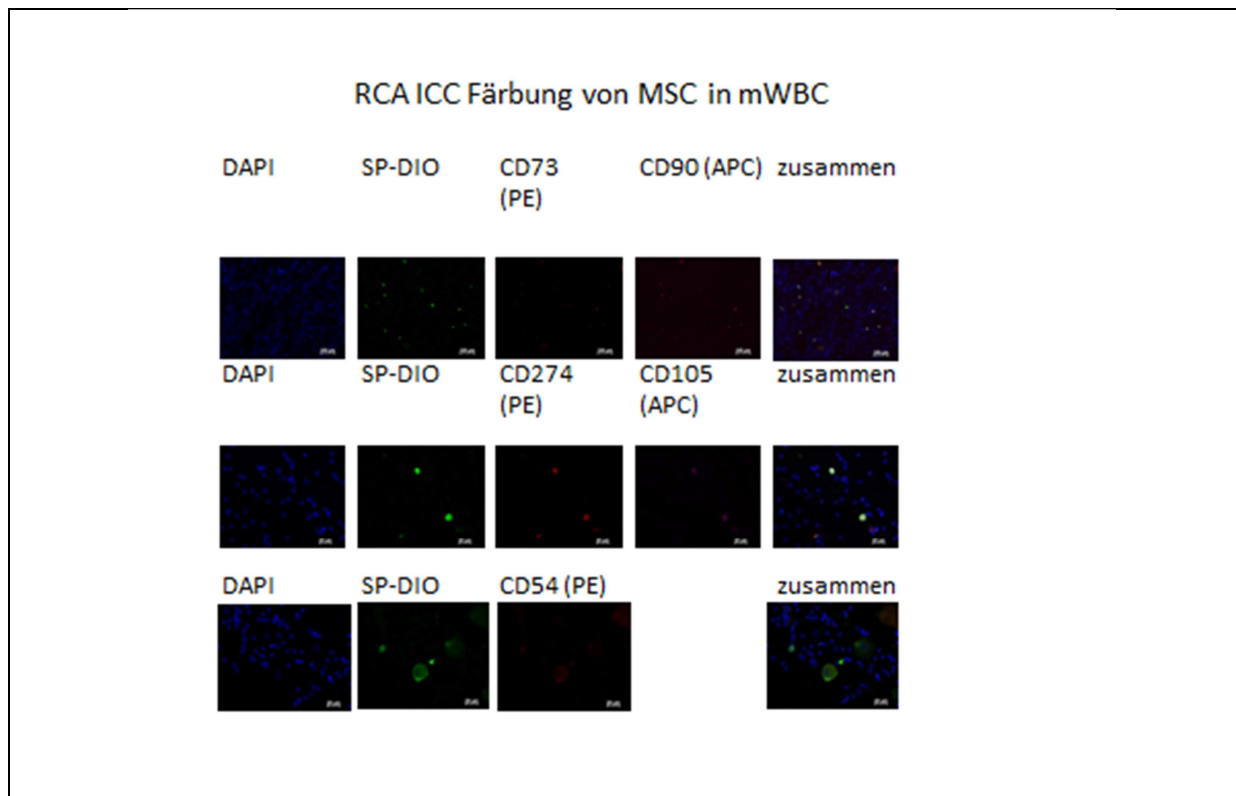


Abbildung 28: SP-DIO gefärbte hUC MSCs zeigen auch mit Mausblut vermischt und nach Prozessierung der RCA in der ICC die positiven ISCT Marker CD73 und CD90.

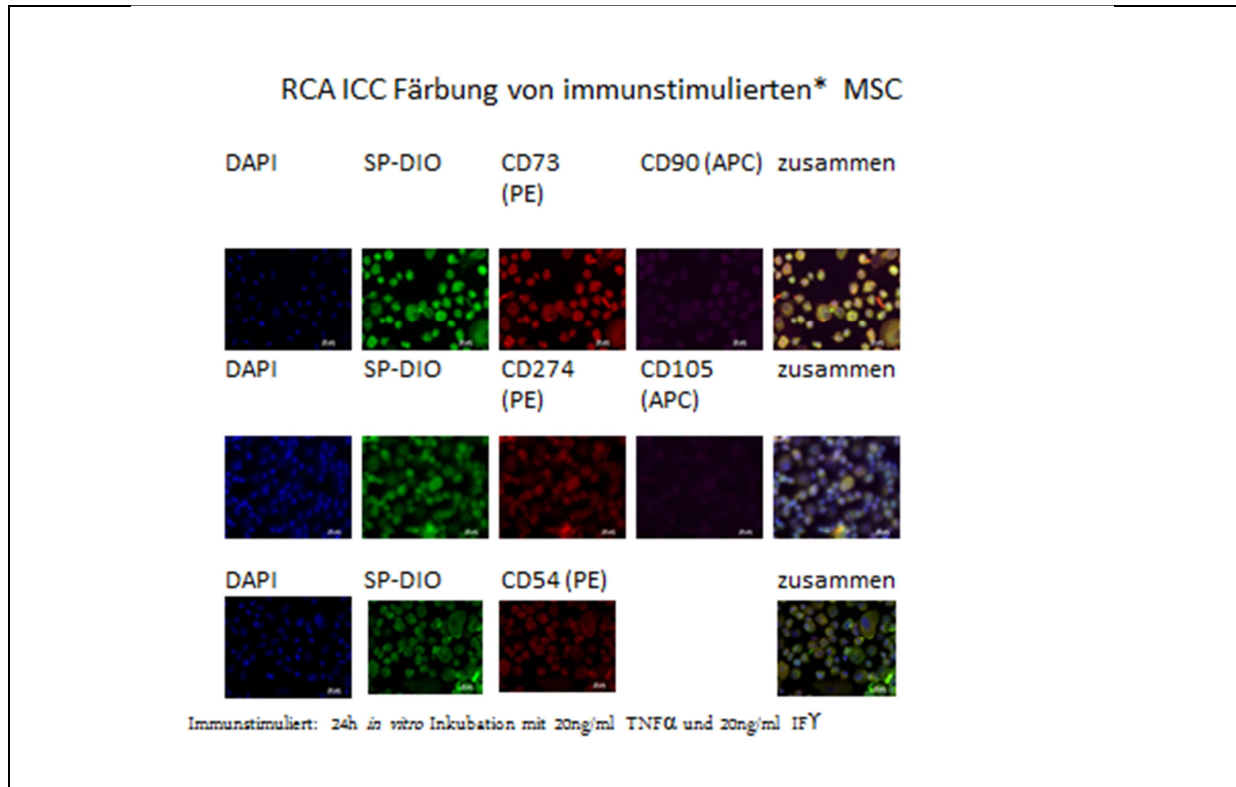


Abbildung 29: Immunstimulierte SP-DIO gefärbte hUC MSCs zeigen in der ICC die positiven ISCT Marker CD73 und CD90.

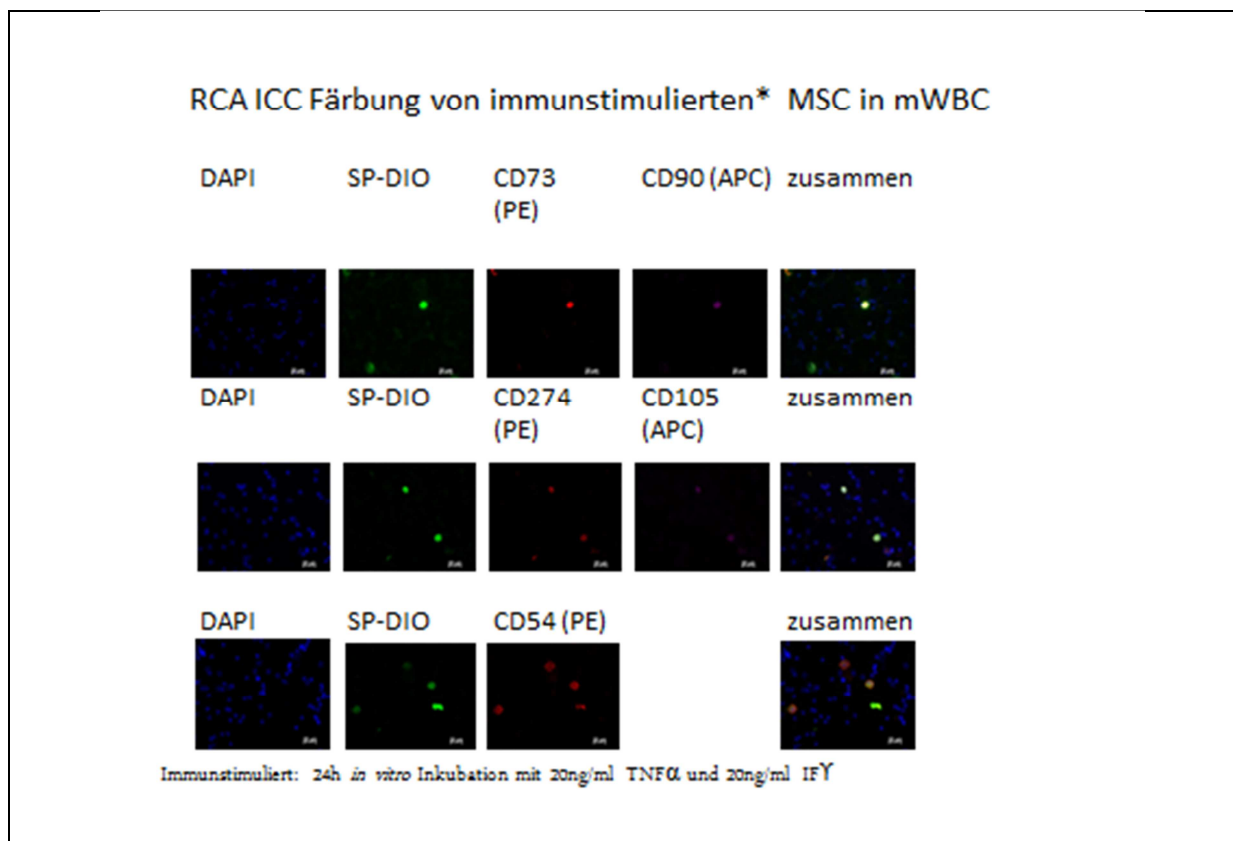


Abbildung 30: Immunstimulierte, SP-DIO gefärbte hUC MSCs zeigen auch mit Mausblut vermisch und nach Prozessierung der RCA in der ICC die positiven ISCT Marker CD73 und CD90.

3.3.1.4 Histologie Ergebnisse

Die Organe der Mäuse wurden nach ihrer Euthanasierung histologisch bzw. histochemisch aufbereitet und mikroskopiert. In den H&E gefärbten Lungen von diabetischen Mäusen und Wildtyp Mäusen konnten 30 Minuten nach der hMSC Transplantation große Zellen gefunden werden, die wahrscheinlich humanen Ursprungs sind (siehe Abbildung 31, Bild A gekennzeichnet durch *). Alveolarmakrophagen wurden in einigen Lungenproben gefunden, deren Auftreten war aber unabhängig von einer hMSC Injektion. Eine IHC von anti-Ratten-Insulin, die kreuzreaktiv mit murinem Insulin ist, zeigt das Vorhandensein von Insulin (braun) in den Langerhans Inseln von Wildtyp Mäusen (siehe Abbildung 31 Bild D) und das Fehlen von Insulin in den Langerhans Inseln der diabetischen NOD Mäuse (siehe Abbildung 31 Bild C). In Abbildung 31 Bild C (markiert durch ~) kann man auch Lymphozyteninfiltrationen in eine Langerhans Insel erkennen. Diese Lymphozyteninfiltrationen sind ein typischer Befund

bei autoimmunem Typ-1 Diabetes wie dem der NOD Maus. Die histologische Untersuchung ist eine wichtige Methode, um die Daten der PCR Analyse zu erhärten.

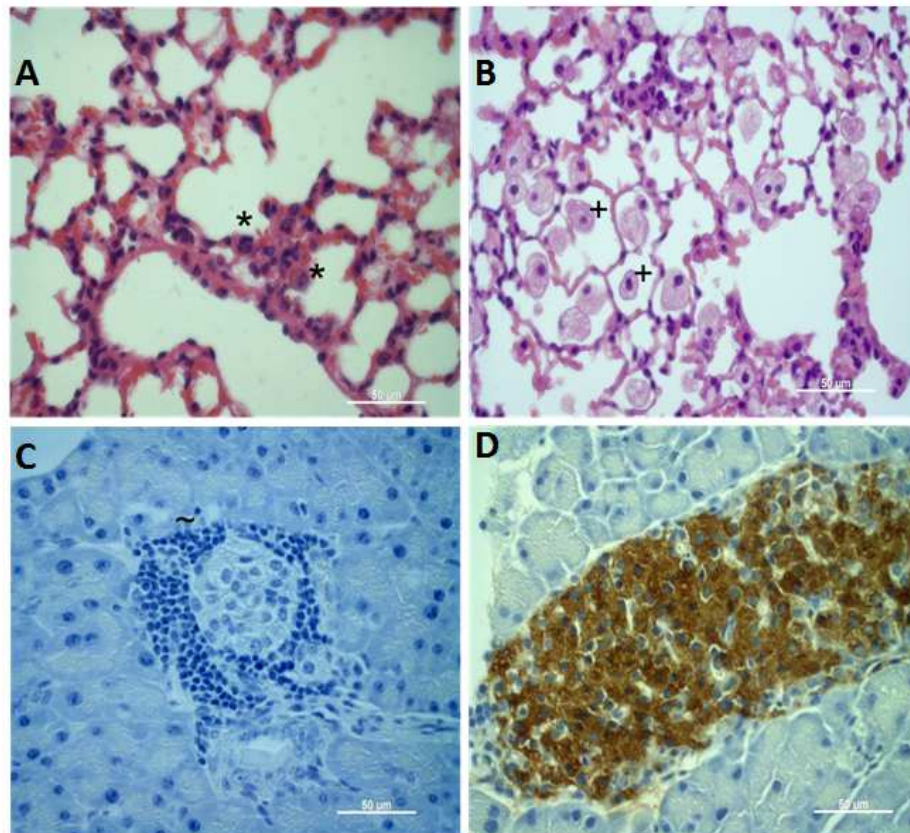


Abbildung 31: Histologische und Immunhistochemische Aufnahmen von Lungen und Pankreata diabetischer und Wildtyp Mäuse 30 Minuten nach einer hMSC Transplantation

In der Abbildung 32 sind Schnitte von Lungen und Pankreata von mit hMSCs injizierten Mäusen wiedergegeben. Die Aufnahmen stammen von diabetischen NOD und nicht-diabetischen Balb/c Mäusen 5 bis 60 Minuten nach Injektion. In den Schnitten der Lungen sind bei beiden Maustypen durch hMSCs hervorgerufene Embolien erkennbar. Lymphozytenaggregate in Langerhans Inseln sind in den Schnitten der NOD Pankreata erkennbar. Dieser Befund änderte sich nicht im Zeitablauf: unabhängig von dem Zeitpunkt der hMSCs-Injektion konnten Lymphozytenaggregate gefunden werden. Als Erklärung hierfür kann der Sachverhalt herangezogen werden, dass sich der Diabetes Status, wie die Blutglukose-Messungen zeigen, nach Zelltherapie nicht ändert.

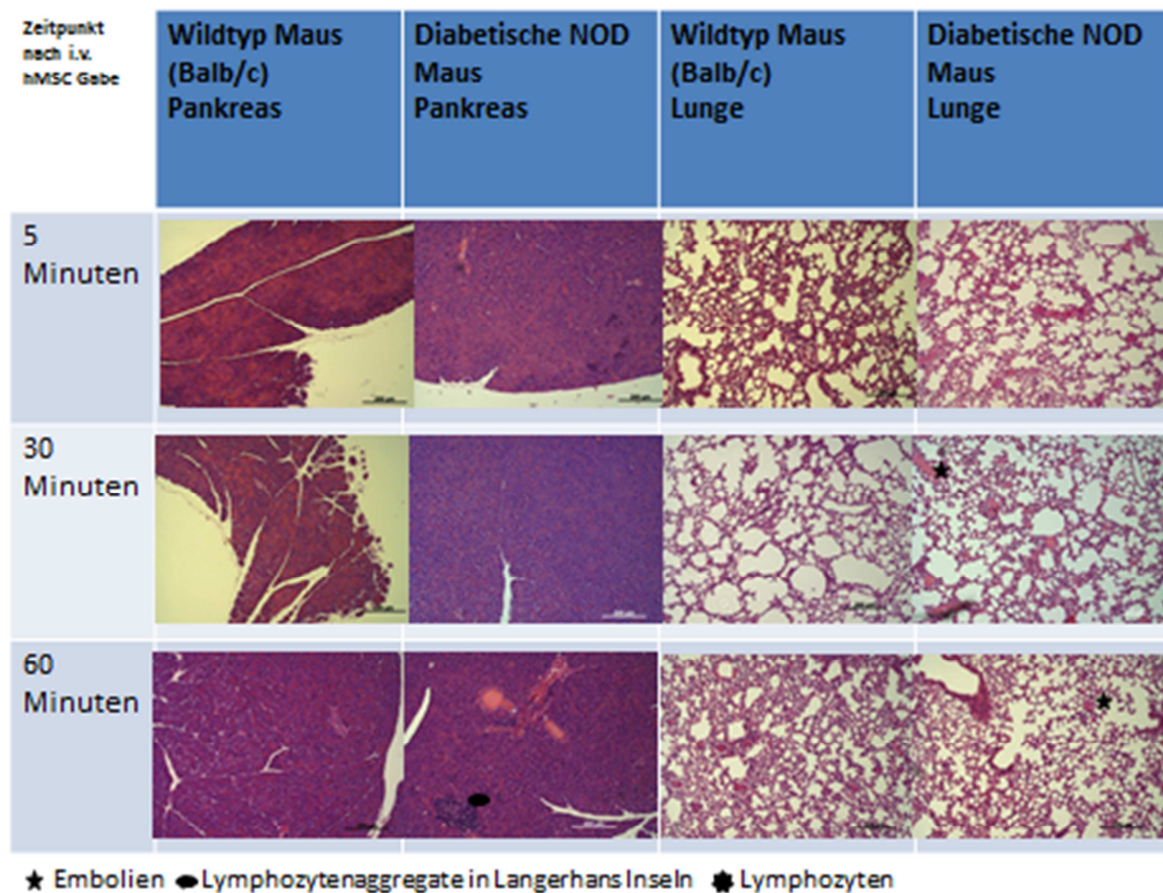


Abbildung 32: Embolien, Lymphozytenaggregate in Langerhans Inseln und Lymphozyten in Mäusen

3.3.1.5 Ergebnisse der Blutglukosebestimmungen

Bei den NOD Mäusen, denen Zellen oder Kontrolle injiziert worden waren, wurde zweimal wöchentlich der Blutglukosespiegel bestimmt. Zum Zeitpunkt der i.v. Injektion der hMSC oder des PBS hatten die Mäuse bereits an zwei aufeinanderfolgenden Wochen einen Blutglukosespiegel von über 300 mg/dl. Auch nach der Behandlung mit MSC oder Vehikel (PBS) lagen die Blutglukosewerte weiterhin im pathologischen Bereich von über 300 mg/dl bis 600 mg/dl weil Werte über 600 mg/dl von dem Roche Accu Check Blutzuckermeßgerät nicht mehr bestimmt werden können. Es konnte keine statistisch signifikante Verbesserung der Blutglukosewerte nach hMSC Injektion im Vergleich zur PBS-Injektion gefunden werden, siehe Abbildung 33.

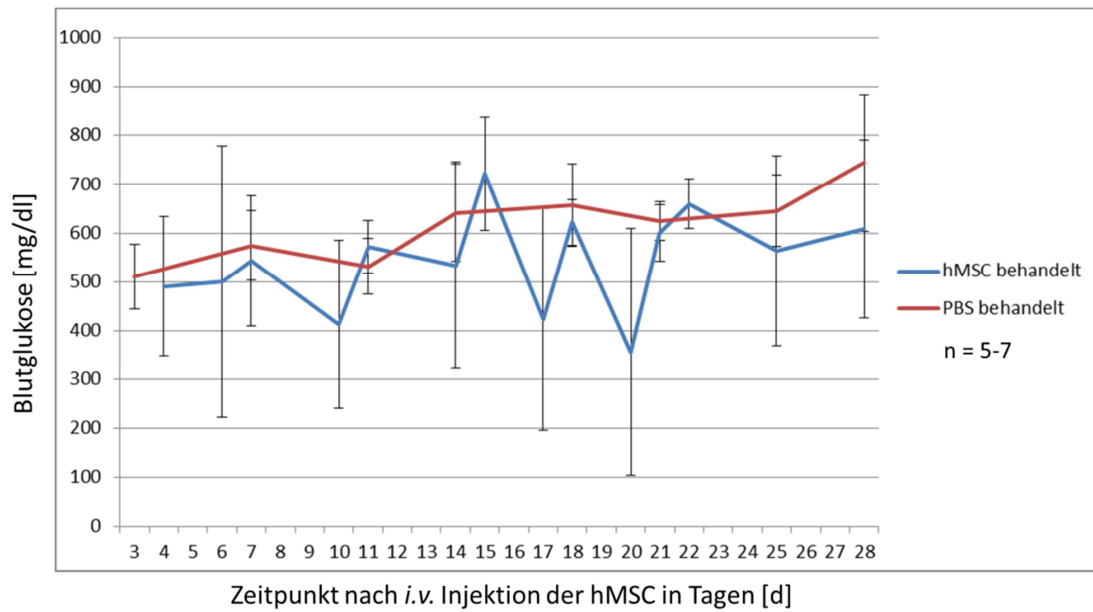


Abbildung 33: Blutglukoseentwicklung von NOD Mäusen nach Injektion von hMSC oder PBS

3.3.1.6 NIRF Ergebnisse

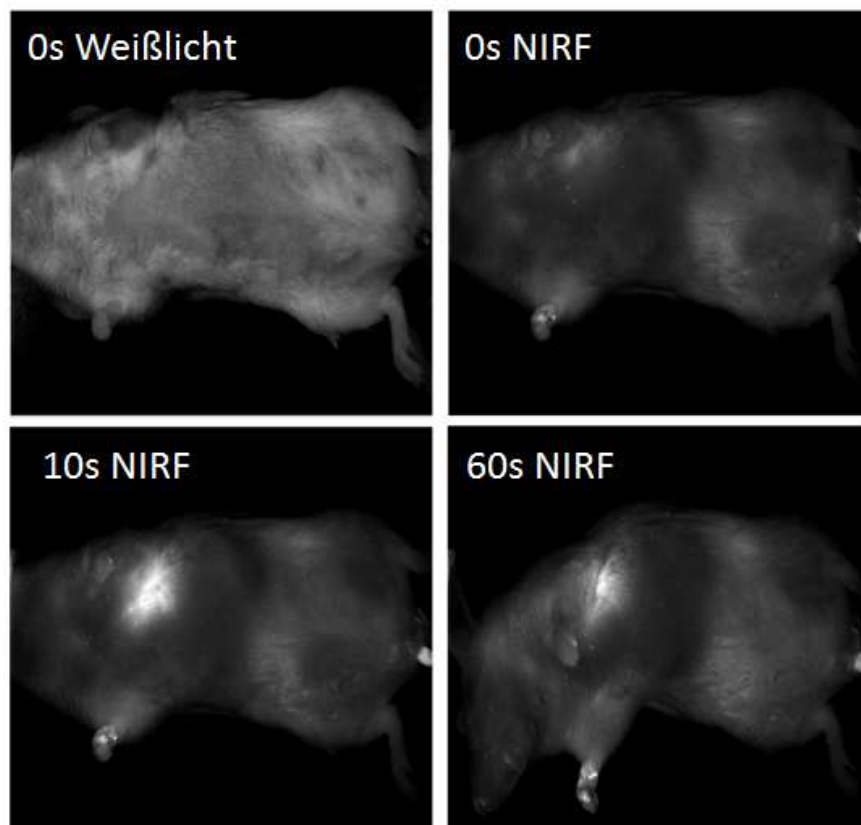


Abbildung 34: NIRF-Experiment: Der Maus wurden $1 \cdot 10^6$ DID-gefärbte hMSCs in die Schwanzvene injiziert und anschließend mit NIRF Licht holographiert.

In der o.a. Abbildung 34 kann man erkennen, dass die hMSCs schon kurz nach der Injektion, also ca. 10 Sekunden später, in der Brustregion akkumulieren. Dies kann bedeuten, dass sie sich entweder in der Lunge befanden - dies würde mit den Daten der anderen Methoden übereinstimmen - oder dass sie sich im Herz der Balb/c Maus angesammelt haben.

3.4 Zusammenfassung Ergebnisse

Die MSC Therapie mit $1 \cdot 10^6$ i.v. injizierten humanen Zellen in seit mindestens zwei Wochen klinisch manifest diabetische Mäuse führte zu keiner Verbesserung des Krankheitszustandes: Die Blutglukosewerte bleiben bis zu vier Wochen unverändert pathologisch hoch. Hierzu stimmig können in den Pankreata diabetischer NOD Mäuse histologisch keine Unterschiede nach MSC-Injektion gesehen werden: Das Fehlen von Insulin und die Lymphozytenaggregationen weisen zwischen den diabetischen Mausgruppen keine Unterschiede auf. Die Daten zur Bioverteilung der injizierten hMSC der verschiedenen Methoden NIRF und PCR sind insofern konsistent, als dass sie eine Akkumulation der humanen Zellen direkt nach i.v. Injektion in die Mauslunge zeigen (PCR) bzw. andeuten (NIRF). Durch die Ergebnisse der RCA konnten keine Aussagen über Verbleib und Qualität humaner MSCs nach i.v. Injektion im Mausblut gemacht werden. Die histochemisch gefärbten Schnitte der Mausorgane zeigen große Zellen unbekannter Herkunft in der Lunge, die vermutlich die zuvor injizierten hMSCs sind. Zur Bestätigung müssten weiterführende immunohistochemische Untersuchungen zum Oberflächenprofil der unbekannten Zellen durchgeführt werden.

4. Diskussion

4.1 Zur Wahl der Methoden für die Analyse der PK in Mäusen

In den Versuchsreihen sollten Mäuse als Modell gewählt werden, die innerhalb einer kurzen Zeitspanne an DM erkranken. Aus den Ergebnissen der Diabetes Onset Tierversuche ergab sich, dass unbehandelte NOD Mäuse zu 50% nach ca. 30 Lebenswochen an DM erkrankten. D.h. die NOD Mäuse können als Diabetes Modell eingesetzt werden und ihre Diabetes Inzidenz lässt sich zeitlich vorhersagen.²⁹⁰

Leukozytenaggregate im Pankreas, ein schneller und schwerer Verlauf des Betazell-Verfalls und andere klinische Merkmale wie Polyurie und Polydispepsie, die in den durchgeführten Experimenten beobachtet werden konnten, zeichnen dieses NOD Mausmodell aus.

Aus den Diabetes Onset Vorversuchen konnte festgestellt werden, dass die mit Cyclophosphamid behandelten NOD Mäuse nicht den in der Literatur beschriebenen Effekt der schnelleren DM Entwicklung aufwiesen. Vielmehr zeigte sich, dass innerhalb eines vorgegebenen Zeitraumes von einigen Wochen weniger behandelte NOD Mäuse an DM erkrankten als unbehandelte NOD Mäuse. Möglicherweise ist der Grund hierfür eine nicht-repräsentative Stichprobe von NOD Mäusen, die in den Versuchen eingesetzt wurden.²⁹¹

Für das Diabetes Modell ungeeignet sind die Balb/c Mäuse. In den Diabetes Onset Vorversuchen entwickelten sie keinen DM - weder nach mehrmaligen niedrig dosierten Streptozotocininjektionen noch nach einmaliger hochdosierter Streptozotocininjektion in Kombination mit einer Fettdiät. Die Balb/c Maus wurde deshalb als nicht geeignet für die DM Versuche angesehen, d.h. sie diente als DM-negative Kontroll- und Versuchsmaus in den hMSC Studien. Ein Grund für das Scheitern des DM Onset in den behandelten Balb/c Mausgruppen ist wahrscheinlich die unterschiedliche Empfindlichkeit der Mausstämme: Im Gegensatz zu dem Balb/c Mausstamm wurde in Baribault et al. 2010 ein anderer Mausstamm C57BL/6J verwendet, der offensichtlich empfindlicher auf Streptozotocin reagiert.

290 Z.B. konnte man aus dem der Diabetes Onset Vorversuch schließen, dass man bei 100 NOD Mäusen 50 DM Inzidenzen erwarten kann, die in dem Zeitraum von 16 bis 30 Lebens-Wochen auftreten.

291 Ein Hinweis auf die Nicht-Repräsentativität ist, dass viele schon vor der Cyclophosphamid-Injektion im Versuch eingesetzten Mäuse eine untypische Fehlstellung der Zähne aufwiesen, während dieses Merkmal bei den in den anderen Testreihen eingesetzten Mäusen fehlte.

Als *in vivo* Tracking Methode wurde NIRF gewählt. Diese Methode ist für kurzzeitige Messungen der PK, d.h. für den Zeitraum in den ersten Minuten nach Injektion, gut geeignet. Insbesondere zeigte sich, dass die Ergebnisse aus den Versuchen mit i.v. injizierten DiD gelabelten hMSCs mit den in der Fachliteratur veröffentlichten Resultaten übereinstimmen. Zudem sind die Ergebnisse konsistent mit den Ergebnissen der durchgeführten PCR Versuche. Für eine längerfristige Analyse der PK dürfte jedoch NIRF ungeeignet sein, weil die Sensitivität von NIRF zu gering ist. Die geringe Sensitivität konnte in durchgeführten Versuchen gezeigt werden: ein hMSC Signal konnte lediglich in der Brustregion der Balb/c Mäuse gefunden werden, obwohl durch die Ergebnisse der durchgeführten PCR Analyse bekannt ist, dass auch in den anderen Organen eine sehr geringe Anzahl an hMSCs vorhanden ist.

Als geeigneter Fluoreszenzmarker, den man z.B. in der RCA *ex vivo* im Blut der Mäuse detektieren kann, hat sich der gewählte SP-DIO bewährt: Die Färbung mit SP-DIO verändert die hMSCs in ihrer Biologie nicht und die ISCT Kriterien für die Definition von MSCs konnten sowohl bei den ungefärbten als auch bei den gefärbten Zellen gezeigt werden. Folgende Befunde für den Marker SP-DIO ergaben sich beim Vergleich von gefärbten zu nicht-gefärbten hMSCs: 1) es gibt keinen Unterschied in der Oberflächenmarkerexpression sowohl der positiven als auch der negativen ISCT Marker, 2) die Differenzierungskapazität in die drei Linien Fett, Knorpel, Knochen unterscheidet sich nicht und 3) die Fähigkeit, Lymphozyten zu inhibieren, ist gleich ausgeprägt. Der Fluoreszenzmarker SP-DIO ist zwar leicht übertragbar im *in vitro* Experiment, zeigt aber eine stabile Emission in den gefärbten Zellen für mindestens 9 Tage und ändert die MSC Biologie nicht.

Hinsichtlich der Wahl der Antikörper, um die hMSCs in der Maus *ex vivo* wiederzufinden, ergaben die durchgeführten immunhistologischen Versuche, dass die positiven ISCT Marker CD90, CD73 und CD105 geeignete Marker sind, um hMSCs auch in der Maus anzufärben.

Als Methoden für die Darstellung der PK wurden RCA, PCR und Histologie eingesetzt. Eine Kombination aus PCR und Histologie hat sich bei der Versuchsdurchführung bewährt: Die PCR stellt sich als Methode der Wahl dar, da sie eine quantitative Aussage über die Anwesenheit menschlicher DNA in den verschiedenen Organen geben konnte. Mit Hilfe der PCR Ergebnisse konnte die Werte des gesuchten Parameters „hMSC Zellzahlen pro Organ“ berechnet werden. Diese experimentell ermittelten Werte decken sich auch mit den in der Literatur angegebenen Werten. Mit der durchgeführten histologischen Analyse der Maus-

Lunge konnten die Ergebnisse der PCR Analyse (Anwesenheit menschlicher DNA im Maus-Organ) um den Nachweis der Lokalisation intakter humaner Zellen im Maus-Organ ergänzt werden. D.h. die verwendete Kombination von PCR und Histologie ist für den Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit brauchbar.

Die RCA Methode ist nicht geeignet, um die PK von hMSCs in Mäusen zu zeigen, da keine hMSCs im Blut der Mäuse wieder gefunden werden konnten.

4.2 Diabetesstatus diabetischer NOD Mäuse unter hMSC-Therapie

Eine der Besonderheiten der MSC Therapien ist, dass ein positiver Effekt in einer Vielzahl an Krankheiten beobachtet werden kann, selbst wenn nur ein verschwindend geringer Anteil der injizierten Zellen ein Homing, Engraftment oder eine Differenzierung durchläuft. Die meisten MSCs verschwinden aus dem Wirtsorganismus²⁹². Im Rahmen dieser Arbeit konnte ebenfalls kein Homing in Richtung des Pankreas bei diabetischen Mäusen nachgewiesen werden, allerdings fehlten auch die positiven Effekte auf den Krankheitsstatus: Der Diabetesstatus war unverändert, eine hMSC Injektion zu einem so späten Zeitpunkt in der DM Pathogenese hatte keinen Einfluss mehr auf die Progression der Krankheit, die diabetischen Mäuse blieben auch nach der hMSC Injektion unverändert krank und mussten spätestens 4 Wochen nach der MSC Transplantation euthanasiert werden.

Erklärt werden kann die fehlende Wirksamkeit der MSC Therapie mit der Wahl des Zeitpunktes: Es war bereits ein klinisch manifester DM bei den NOD Mäusen ausgebrochen bevor sie behandelt wurden. Es ist also davon auszugehen, dass nicht genug Betazellmasse für eine Regeneration des Pankreas übrig war. Abbildung 35 zeigt, dass die Wahl des Zeitpunktes entscheidend für den Therapieerfolg sein kann.

Nach Si²⁹³ wurde der positive Effekt der MSC Therapie auf die metabolische Funktion deutlicher, wenn die Stammzelltherapie nach Induktion des DM früh (7 Tage) anstatt spät (21 Tage) erfolgte. Auch mit MSCs aus KM konnte gezeigt²⁹⁴ werden, dass sich der DM nur dann besserte, wenn die Therapie vor dem Auftreten der Hyperglykämie begonnen wurde.

292 Parekkadan and Milwid 2010

293 Si et al. 2012

294 Pileggi 2012

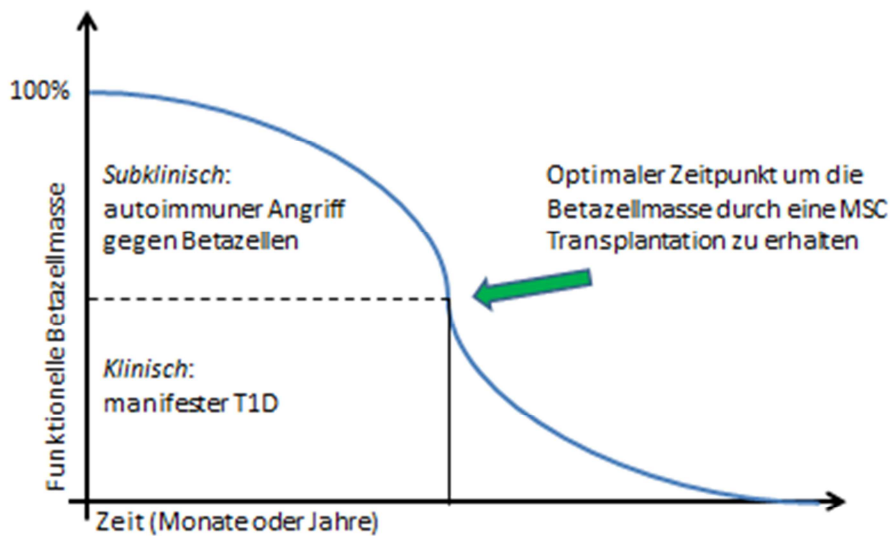


Abbildung 35: Optimaler Zeitpunkt für die MSC Therapie, Quelle: modifiziert nach Couri et al. 2012

4.3 Sicherheit und Bioverteilung von i.v. applizierten hMSCs in Mäusen

Die meisten Homing und Engraftment Studien mit hMSCs in Nagern zeigten, selbst unter optimalen Bedingungen, entweder keinen oder einen sehr geringen Engraftment Effekt; d.h. höchstens einen kurzzeitigen Effekt von unter einer Woche²⁹⁵. Entsprechend diesen Literaturdaten konnte auch im Rahmen dieser Arbeit kein lang anhaltender Engraftment Effekt nach der i.v. Injektion von hMSCs in diabetische und Wildtyp Mäuse entdeckt werden: Die PCR Daten zeigen einen Abfall der gefundenen hMSCs in allen Mausorganen mit der Folge, dass verschwindend geringe Mengen an humaner DNA in den Mausorganen nach 4-6 Wochen gefunden werden konnten.

Da die Anzahl der hMSCs, die in der Lunge der Balb/c sowie der NOD Mäuse gefunden werden konnte, um ein Vielfaches größer ist als die Anzahl der hMSCs in allen anderen Organen zusammen, kann man davon ausgehen, dass die Zellen nach i.v. Injektion zuerst in der Lunge gefangen werden und zufällig mit dem Blut in geringem Umfang auf die anderen

²⁹⁵ Parekkadan und Milwid 2010

Organe verteilt werden. Das Entrapment (Gefangenwerden) im Gefäßgeflecht der Lunge bei intravenös injizierten Zellen ist in der Literatur bereits beschrieben worden²⁹⁶. Die Akkumulierung von hMSCs nach i.v. Injektion in den Lungen der injizierten Mäuse kann durch die enorme Größe der hMSCs erklärt werden, außerdem durch eine Reihe von Adhäsionsmolekülen, die insbesondere bei immunogener Aktivierung exprimiert werden: Die kleinen Kapillaren in der Lunge von Nagetieren können so zur Falle für die hMSCs werden²⁹⁷. In Nystedt²⁹⁸ konnte ein Zusammenhang zwischen der Konfluenz der MSCs in Kultur, der Fibronektinexpression und der Lungenadhärenz beobachtet werden. Es sind also viele Faktoren, die zum oft beobachteten Entrapment in der Lunge MSC-injizierter Tiere beitragen.

Nach dem Entrapment in der Lunge wurde in verschiedenen Studien eine sich zeitlich anschließende Verteilung in die Leber beobachtet²⁹⁹, was im Rahmen dieser Arbeit nicht auftrat. Die Verteilung in andere Organe ist geringfügig und scheint zufällig zu sein, weshalb ich ein Dreikompartimentmodell vorschlage, siehe Abbildung 36: Durch die Injektion in die Schwanzvene gelangen die MSCs in das Blut der Maus (Kompartiment 1), von dort durch die Lungenpassage in die Lunge (Kompartiment 2) und dann nach zufälliger und geringfügiger Verteilung in die anderen Organe (Kompartiment 3). Ein Clearing findet in allen Kompartments statt, wobei das Clearing aus der Lunge am stärksten ausfällt, in der sich die meisten MSCs angesammelt haben.

4.4 Vergleich der Pharmakokinetik in Wildtyp und Diabetes Typ 1 Mäusen

Die Daten der PCR von Diabetes und Wildtyp-Mäusen sind vergleichbar: Es gibt eine Anflutung in der Lunge von i.v. injizierten hMSCs (80-100% der eingesetzten Zellen), eine zufällige Verteilung der hMSCs in alle anderen Organe und ein anschließendes Clearing, d.h. ein Verlust der menschlichen DNA in den Maus-Organen bis hin zu vernachlässigbar kleinen Werten nach 4-6 Wochen. Einen sogenannten Homing Effekt³⁰⁰, also das zielgerichtete Wandern der hMSCs an den Ort der Entzündung (in diesem Fall das Pankreas) konnte nicht

296 Barbash et al. 2003b; Barbash et al. 2003a

297 Barbash et al. 2003a

298 Nystedt et al. 2013

299 Ruster et al. 2006; Gao et al. 2001

300 Ein Homing wäre im vorliegenden Fall pharmakologisch ein TMDD ähnlicher Effekt,

beobachtet werden. Laut Literatur³⁰¹ homen maximal 0,5% der Zellen, was bei den großen Schwankungen, die zwischen den Einzeltieren auftraten, ein zu geringer Unterschied ist, um ihn mit der Real-Time-PCR Methode detektieren zu können. In Abbildung 36 wird, wie oben erwähnt, ein pharmakologisches Drei-Kompartiment-Modell für die i.v. Injektion von MSCs vorgeschlagen: Die injizierten MSCs werden in das erste Kompartiment Blut injiziert und kommen von dort durch zufällige Verteilung in das dritte Kompartiment, alle Gewebe und Organe (außer der Lunge). In das zweite Kompartiment, die Lunge, kommen die MSCs durch den Blutfluss sehr schnell und verbleiben dort zu 80-100% aufgrund der Enge der Lungenkapillaren. Die Clearancerate (aktiv und passiv) ist in allen Kompartments so hoch, dass es nach sechs Wochen fast keine MSCs mehr im Empfängerorganismus gibt.

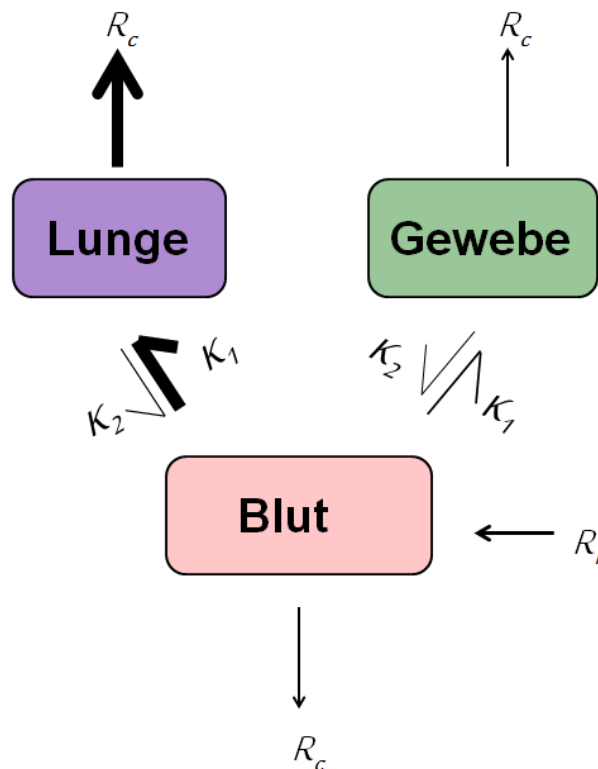


Abbildung 36: Vorgeschlagenes Pharmakokinetisches Drei-Kompartiment-Modell von i.v. injizierten hMSCs

Erläuterung zu Abbildung 36: K_1 = Rate an Gewebe Extravasation; K_2 = Rate an Gewebe Intravasation; R_c = Rate der Clearance; R_i = Rate des Influx. Die Daten der Analysen in dieser Arbeit legen nahe, dass es nach i.v. Injektion von MSCs in einen Organismus zu einer Anhäufung der injizierten Zellen in der Lunge kommt, der durch den Blutfluss bedingt ist. Die Lunge ist die erste für Zellen enge Passage nach i.v. Injektion. Anschließend kommt es zu geringfügigen und zufälligen Zellverteilungen in andere Organe, gefolgt von einem aktiven oder passiven Clearing

über den Zeitraum von sechs Wochen. Es konnten keine aktiven Homing- oder Migrationsprozesse gefunden werden, weder in diabetischen, noch in gesunden Mäusen. Dieser Befund legt die Hypothese eines pharmakologischen Drei - Kompartiment-Modells nahe, bei der eine schnelle Extravasation in die Lunge und nur zufällige, kleinere Extravasationen in andere Organe erfolgen.

4.5 Anwendungen und Perspektive

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass die MSC Zelltherapie Typ 1 diabetischer Mäuse zu einem Zeitpunkt, bei dem ca. über 80% der Betazellmasse bereits zerstört wurden,³⁰² zu keiner Verbesserung des Krankheitsstatus des DM führte. Da bereits beschrieben wurde, dass die Zelltherapie zu einem früheren Zeitpunkt in der DM Pathogenese positive Effekte im Tiermodell³⁰³ haben kann, bedeutet das für eine in der Zukunft mögliche Zelltherapie für menschliche Patienten, dass in einem solchen Fall diese Therapie an Stelle einer Heilung eher als eine Prophylaxe eingesetzt gesehen werden dürfte. Es ist bekannt, dass Kinder, die einen DM Typ 1 entwickeln werden, schon vor Ausbruch der Krankheit Autoantikörper gegen Inselzellantigene³⁰⁴ entwickeln. Für diesen Personenkreis könnte in Zukunft bei weiteren Fortschritten in der Forschung und, sofern Sicherheitsaspekte dies zulassen, eine Anwendung der MSC Therapie stattfinden, um den betroffenen Patienten das Fortschreiten oder sogar den Ausbruch eines autoimmunen DM zu ersparen.

Eine weitere Erkenntnis aus den Daten dieser Arbeit ist, dass sich die Pharmakokinetik von hMSCs bei diabetischen und gesunden Mäusen nicht oder nur in sehr geringem Maße unterscheidet. Laut Literatur ist die Lokalisation der hMSCs für einen Therapieerfolg nicht entscheidend³⁰⁵ – jedoch sprechen naheliegende Gründe dagegen, menschlichen Patienten MSCs i.v. zu injizieren, welche sich dann zu fast 100% in der Lunge akkumulieren. Bei den in den Tests dieser Arbeit eingesetzten Mäusen führten die hMSCs teils zu tödlichen Embolien. Hierbei konnte ein Zusammenhang zwischen der Charge der aufgetauten hMSCs und der Rate an Embolien festgestellt werden:

302 Die Mäuse hatten an zwei aufeinanderfolgenden Wochen Blutglukosewerte von über 300 mg/dl, was laut Moore 2001 auf diesen Restwert an Betazellmasse schließen lässt. Die histologischen Untersuchungen bestätigen diese Theorie.

303 Si et al. 2012; Pileggi 2012

304 Groop and Pociot 2013

305 In Gabr et al. 2013 konnten z.B. unter die Nierenkapsle injizierte MSCs die Blutglukoselevel in einem DM Modell verbessern.

Alle Zellen wurden subjektiv mit den gleichen Reagenzien und Protokollen in gleicher Weise behandelt. Sie kamen aus der gleichen Passage (Passage vier) vom jeweils gleichen Donor. Der einzige Unterschied bestand darin, dass die drei Chargen zu drei verschiedenen Zeitpunkten vermehrt und eingefroren wurden. Für die beobachteten Unterschiede in der Emboliehäufigkeit von 2% bei einer Charge bis hin zu 30% bei einer anderen Charge von MSCs dürfte die Erklärung zutreffen, dass die Konfluenz in der Zellkulturflasche und damit auch das Oberflächenprofil der Zell-Chargen minimal abweichend gewesen waren.

Für die Klärung des unterschiedlichen Verhaltens einzelner Chargen gleicher Zellen besteht noch Forschungsbedarf, u.a. mit dem Ziel der Verbesserung der Protokolle für die Anwendung im Menschen. Je weniger MSCs in den Kapillaren der Lunge gefangen werden, desto weniger können die MSCs einen schädlichen Effekt auf die Lungen der Patienten haben, so dass Methoden zur Vermeidung der Adhärenz von MSCs entwickelt werden müssen. Schrepfer et al. 2007 haben bereits mit der Inkubierung der MSCs mit Natrium-Nitroprussid einen Schritt in diese Richtung unternommen.

5. Zusammenfassung / Summary

5.1 Zusammenfassung

Ziele dieser Arbeit ist der visuelle Einblick in die Pharmakokinetik von MSCs in einem geeigneten Mausmodells, die Evaluierung der verwendeten Methoden und eines entsprechenden Markers, sowie die Charakterisierung sich im Blut befindlicher hMSCs mit der RCA. In Versuchen mit Typ1-diabetischen NOD Mäusen wurde zudem nach einer Veränderung des Krankheitsstatus durch Blutglukosemessungen gesucht. Die Untersuchung der Unterschiede der MSC Pharmakokinetik in Wildtyp-Mäusen und Mäusen mit Diabetes mellitus Typ 1 (T1D) anhand beschriebener Methoden war Teil der Analyse.

Die Blutglukosemessungen von an T1D erkrankten Mäusen nach Injektion mit hMSCs oder nach Injektionen mit PBS unterschieden sich nicht signifikant voneinander, so dass kein positiver Einfluss der i.v. applizierten hMSCs auf die Betazellen des erkrankten Pankreas nachgewiesen werden konnte. Widersprüche zu aktuellen Daten in der wissenschaftlichen

Literatur lassen sich mit dem späten Zeitpunkt der Therapie und mit dem Alter der Mäuse erklären.

Es konnte gezeigt werden, dass die RCA keine geeignete Methode ist, um im Blut zirkulierende hMSCs zu detektieren bzw. zu analysieren, da mit Hilfe dieser Methode zu keinem Zeitpunkt intakte Zellen im Blut injizierter Mäuse wiedergefunden werden konnten. Die Real-Time PCR stellte sich als eine angemessene Methode dar, da sie empfindlich genug zur Detektion kleinster Mengen humaner DNA ist. Auch lässt die gefundene Menge an humaner DNA und auf die in dem gesamten Maus-Organ befindliche Anzahl humaner Zellen umrechnen. Die Daten, die eine Akkumulation der hMSCs in der Maus Lunge mit 70-100% der injizierten Zellen und eine nur zufällige Verteilung mit anschließender Abnahme in andere Organe zeigen, stimmen mit der aktuellen Literatur überein. Der direkte Vergleich der PK unter Verwendung von engmaschig erhobenen pharmakokinetischen Daten über einen Zeitraum von sechs Wochen zwischen einem Krankheitsmodells einerseits und einer gesunden Wildtypmaus andererseits, wurde bisher nicht gezeigt. Die Ergebnisse dieses Vergleichs erhärten die Aussage, dass das Homen nicht oder in nur sehr geringem Ausmaß, stattfindet. Die histologischen und die NIRF Daten bestätigen die Beobachtungen durch die PCR Analyse.

Schlagwörter: Mesenchymale Stammzellen, Pharmakokinetik, Zelltherapie, Diabetes mellitus, Zell Tracking

5.2 Summary

The aim of this work is the visual insight into the pharmacokinetics of MSCs in a mouse model, the evaluation of the used methods and the characterization of hMSCs in blood by RCA. It was also searched for a change in diabetes disease status by blood glucose measurements in experiments with type 1 diabetic NOD (T1D) mice. The study of the differences between MSC pharmacokinetics in wild-type mice and mice suffering from type 1 diabetes mellitus was another part of the analysis.

When injected with hMSCs, T1D mice showed no significantly different blood glucose levels afterwards compared to the PBS-treated control group. There seems to be no positive effect of

i.v. applied MSCs on beta cells mass in the diseased pancreas. Some scientific literature states otherwise – this discrepancy can be explained by the setting of the experiments in this work: the late stage of the MSC therapy in diabetic mice and the age of the mice.

It was shown that the RCA is not a suitable method to detect circulating hMSCs in the blood of the injected mice and to analyze the injected cells respectively: hMSCs could not be detected at any chosen time-point within the blood of the injected mice.

The real-time PCR turned out to be a suitable method since it is sensitive enough to detect very small amounts of human DNA and its data can also be calculated to get the number of whole human cell per mouse organ. The data shows an accumulation of hMSCs in the mouse lung with 70-100 % of the injected cells but only random distribution into other organs with subsequent decrease. These findings are consistent with current literature. The direct comparison of a disease model with a healthy wild-type mouse model and the pharmacokinetic data collected over six weeks has not yet been demonstrated. It confirms the assertion that homing does not, or only to a very small extent, takes place. The histological and NIRF data confirm the observations seen by data of the PCR analysis.

Key Words: Mesenchymal Stem Cells, Pharmacokinetics, Cell Therapy, Diabetes mellitus, Cell Tracking

6. Literatur

Abumaree M, Al JM, Pace RA, Kalionis B (2012). Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev* 8: 375-392.

Aguayo-Mazzucato C, Bonner-Weir S (2010). Stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 6: 139-148.

Aguilar S, Nye E, Chan J, Loebinger M, Spencer-Dene B, Fisk N, et al. (2007). Murine but not human mesenchymal stem cells generate osteosarcoma-like lesions in the lung. *Stem Cells* 25: 1586-1594.

Ahmadbeigi N, Seyedjafari E, Gheisari Y, Atashi A, Omidkhoda A, Soleimani M (2010). Surface expression of CXCR4 in unrestricted somatic stem cells and its regulation by growth factors. *Cell Biol Int* 34: 687-692.

Allan AL, Vantghem SA, Tuck AB, Chambers AF, Chin-Yee IH, Keeney M (2005). Detection and quantification of circulating tumor cells in mouse models of human breast cancer using immunomagnetic enrichment and multiparameter flow cytometry. *Cytometry Part A* 65: 4-14.

Allers C, Sierralta WD, Neubauer S, Rivera F, Minguell JJ, Conget PA (2004). Dynamic of distribution of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells after transplantation into adult unconditioned mice. *Transplantation* 78: 503-508.

Altman AM, Yan Y, Matthias N, Bai X, Rios C, Mathur AB, et al. (2009). IFATS collection: Human adipose-derived stem cells seeded on a silk fibroin-chitosan scaffold enhance wound repair in a murine soft tissue injury model. *Stem Cells* 27: 250-258.

Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, et al. (2007). Term Amniotic membrane is a high throughput source for multipotent Mesenchymal Stem Cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol* 7: -11.

Anderson MS, Bluestone JA (2005). The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Annu Rev Immunol* 23: 447-485.

Anjos-Afonso F, Siapati EK, Bonnet D (2004). In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *J Cell Sci* 117: 5655-5664.

Ankrum J, Karp JM (2010). Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *Trends Mol Med* 16: 203-209.

Anzalone R, Lo IM, Loria T, Di SA, Giannuzzi P, Farina F, et al. (2011). Wharton's jelly mesenchymal stem cells as candidates for beta cells regeneration: extending the differentiative and immunomodulatory benefits of adult mesenchymal stem cells for the treatment of type 1 diabetes. *Stem Cell Rev* 7: 342-363.

Azzi J, Geara AS, El-Sayegh S, Abdi R (2010). Immunological aspects of pancreatic islet cell transplantation. *Expert Rev Clin Immunol* 6: 111-124.

Bacenkova D, Rosocha J, Tothova T, Rosocha L, Sarissky M (2011). Isolation and basic characterization of human term amnion and chorion mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 13: 1047-1056.

Bai X, Yan Y, Coleman M, Wu G, Rabinovich B, Seidensticker M, et al. (2011). Tracking long-term survival of intramyocardially delivered human adipose tissue-derived stem cells using bioluminescence imaging. *Mol Imaging Biol* 13: 633-645.

Banerjee M, Kumar A, Bhonde RR (2005). Reversal of experimental diabetes by multiple bone marrow transplantation. *Biochem Biophys Res Commun* 328: 318-325.

Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, et al. (2003a). Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation* 108: 863-868.

Baribault H (2010). Mouse models of type II diabetes mellitus in drug discovery. *Methods Mol Biol* 602: 135-155.

Bell GI, Broughton HC, Levac KD, Allan DA, Xenocostas A, Hess DA (2012). Transplanted human bone marrow progenitor subtypes stimulate endogenous islet regeneration and revascularization. *Stem Cells Dev* 21: 97-109.

Bentzon JF, Stenderup K, Hansen FD, Schroder HD, Abdallah BM, Jensen TG, et al. (2005). Tissue distribution and engraftment of human mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 330: 633-640.

Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, Cometa AM, Avanzini MA, Moretta A, et al. (2007). Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Do Not Undergo Transformation after Long-term In vitro Culture and Do Not Exhibit Telomere Maintenance Mechanisms. *Cancer Research* 67: 9142-9149.

Bhansali A, Upreti V, Khandelwal N, Marwaha N, Gupta V, Sachdeva N, et al. (2009). Efficacy of autologous bone marrow-derived stem cell transplantation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Stem Cells Dev* 18: 1407-1416.

Bianco P, Cao X, Frenette PS, Mao JJ, Robey PG, Simmons PJ, et al. (2013). The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med* 19: 35-42.

Bianco P, Robey PG, Simmons PJ (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* 2: 313-319.

Bode BW, Schwartz S, Stubbs HA, Block JE (2005). Glycemic characteristics in continuously monitored patients with type 1 and type 2 diabetes: normative values. *Diabetes Care* 28: 2361-2366.

Brode S, Raine T, Zacccone P, Cooke A (2006). Cyclophosphamide-induced type-1 diabetes in the NOD mouse is associated with a reduction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* 177: 6603-6612.

Burdon TJ, Paul A, Noiseux N, Prakash S, Shum-Tim D (2011). Bone marrow stem cell derived paracrine factors for regenerative medicine: current perspectives and therapeutic potential. *Bone Marrow Res* 2011: -207326.

Calne RY, Gan SU, Lee KO (2010). Stem cell and gene therapies for diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 6: 173-177.

Calo E, Quintero-Estades JA, Danielian PS, Nedelcu S, Berman SD, Lees JA (2010). Rb regulates fate choice and lineage commitment in vivo. *Nature* 466: 1110-1114.

Caplan AI (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9: 641-650.

Caplan AI (2005). Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 11: 1198-1211.

Caplan AI (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213: 341-347.

Carvalho MM, Teixeira FG, Reis RL, Sousa N, Salgado AJ (2011). Mesenchymal stem cells in the umbilical cord: phenotypic characterization, secretome and applications in central nervous system regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 6: 221-228.

Castillero-Trejo Y, Eliazer S, Xiang L, Richardson JA, Ilaria RL, Jr. (2005). Expression of the EWS/FLI-1 oncogene in murine primary bone-derived cells Results in EWS/FLI-1-dependent, ewing sarcoma-like tumors. *Cancer Res* 65: 8698-8705.

Chao KC, Chao KF, Fu YS, Liu SH (2008). Islet-like clusters derived from mesenchymal stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord for transplantation to control type 1 diabetes. *PLoS ONE* 3: -e1451.

Chapon C, Jackson JS, Aboagye EO, Herlihy AH, Jones WA, Bhakoo KK (2009). An in vivo multimodal imaging study using MRI and PET of stem cell transplantation after myocardial infarction in rats. *Mol Imaging Biol* 11: 31-38.

Chen LB, Jiang XB, Yang L (2004). Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol* 10: 3016-3020.

Chi ZH, Lu Y, Zhang Y (2008). Study on differentiation of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood into insulin secreting cells. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 29: 679-683.

Chiu RCJ (2005) "Stealth Immune Tolerance" in Stem Cell Transplantation: Potential for "Universal Donors" in Myocardial Regenerative Therapy. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 24, Issue 5: 511-516.

Choi AO, Maysinger D (2008): Applications of quantum dots in biomedicine. In: Rogach A (ed). *Semiconductor Nanocrystal Quantum Dots*. Springer Vienna. pp 349-365.

Choumerianou DM, Dimitriou H, Perdikogianni C, Martimianaki G, Riminucci M, Kalmanti M (2008). Study of oncogenic transformation in ex vivo expanded mesenchymal cells, from paediatric bone marrow. *Cell Prolif* 41: 909-922.

Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ (2001). Identification of a subpopulation of rapidly selfrenewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7841-7845.

Colvin GA, Lambert JF, Abedi M, Hsieh CC, Carlson JE, Stewart FM, Quesenberry PJ (2004). Murine marrow cellularity and the concept of stem cell competition: geographic and quantitative determinants in stem cell biology. *Leukemia*. 18(3):575-83.

Conrad C, Niess H, Huss R, Huber S, von L, I, Nelson PJ, et al. (2009). Multipotent mesenchymal stem cells acquire a lymphendothelial phenotype and enhance lymphatic regeneration in vivo. *Circulation* 119: 281-289.

Constantin G, Marconi S, Rossi B, Angiari S, Calderan L, Anghileri E, et al. (2009). diposederived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells* 27: 2624-2635.

Couri CE, de Oliveira MC, Simoes BP (2012). Risks, benefits, and therapeutic potential of hematopoietic stem cell transplantation for autoimmune diabetes. *Curr Diab Rep* 12: 604-611.

Dössel, O.: Bildgebende Verfahren in der Medizin (2000). Springer, Berlin Heidelberg.

Dominguez-Bendala J, Lanzoni G, Inverardi L, Ricordi C (2012). Concise review: mesenchymal stem cells for diabetes. *Stem Cells Transl Med* 1: 59-63.

Dominici M, Le BK, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8: 315-317.

Dong QY, Chen L, Gao GQ, Wang L, Song J, Chen B, et al. (2008). Allogeneic diabetic mesenchymal stem cells transplantation in streptozotocin-induced diabetic rat. *Clin Invest Med* 31: E328-E337.

Dufort S, Sancey L, Wenk C, Josserand V, Coll JL (2010). Optical small animal imaging in the drug discovery process. *Biochim Biophys Acta* 1798: 2266-2273.

Ende N, Chen R, Reddi AS (2004). Effect of human umbilical cord blood cells on glycemia and insulinitis in type 1 diabetic mice. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 665-669.

English K, Mahon BP (2011). Allogeneic mesenchymal stem cells: agents of immune modulation. *J Cell Biochem* 112: 1963-1968.

English K, Mahon BP, Wood KJ (2013). Mesenchymal Stromal Cells; Role in Tissue Repair, Drug Discovery and Immune Modulation. *Curr Drug Deliv*.

Ensenat-Waser R, Pellicer A, Simon C (2009). Reprogrammed induced pluripotent stem cells: how suitable could they be in reproductive medicine? *Fertil Steril* 91: 971-974.

Ensenat-Waser R, Santana A, Vicente-Salar N, Cigudosa JC, Roche E, Soria B, et al. (2006). Isolation and characterization of residual undifferentiated mouse embryonic stem cells from embryoid body cultures by fluorescence tracking. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 42: 115-123.

Esmatjes E, Montana X, Real MI, Blanco J, Conget I, Casamitjana R, et al. (2010). Regeneration of insulin production by autologous bone marrow blood autotransplantation in patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 53: 786-789.

Evans MJ, Kaufman MH (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156.

Fandrich F, Ungefroren H (2010). Customized cell-based treatment options to combat autoimmunity and restore beta-cell function in type 1 diabetes mellitus: current protocols and future perspectives. *Adv Exp Med Biol* 654: 641-665.

Fazeli Farsani S, Aa MP, Vorst MMJ, Knibbe CAJ, Boer A (2013). Global trends in the incidence and prevalence of type 2 diabetes in children and adolescents: a systematic review and evaluation of methodological approaches. *Diabetologia*: 1-18.

Fiorina P, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La RS, et al. (2009). Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *J Immunol* 183: 993-1004.

Frangioni JV (2003). In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol* 7: 626-634.

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6: 230-247.

Fujikawa T, Oh SH, Pi L, Hatch HM, Shupe T, Petersen BE (2005). Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells. *Am J Pathol* 166: 1781-1791.

Furlani D, Ugurlucan M, Ong L, Bieback K, Pittermann E, Westien I, et al. (2009). Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? Mesenchymal stem cells and intravital microscopy. *Microvasc Res* 77: 370-376.

Furth ME, Atala A (2009). Stem cell sources to treat diabetes. *J Cell Biochem* 106: 507-511.

Furuta Y, Horiguchi M, Sugaru E, Ono-Kishino M, Otani M, Sakai M, et al. (2010). Chronic administration of DSP-7238, a novel, potent, specific and substrate-selective DPP IV inhibitor, improves glycaemic control and beta-cell damage in diabetic mice. *Diabetes Obes Metab* 12: 421-430.

Gabr MM, Zakaria MM, Refaie AF, Ismail AM, bou-El-Mahasen MA, Ashamallah SA, et al. (2013). Insulin-producing cells from adult human bone marrow mesenchymal stem cells control streptozotocin-induced diabetes in nude mice. *Cell Transplant* 22: 133-145.

Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI (2001). The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs* 169: 12-20.

Garcia S, Bernad A, Martin MC, Cigudosa JC, Garcia-Castro J, de la FR (2010). Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 316: 1648-1650.

- Gepts W (1965). Pathologic anatomy of the pancreas in juvenile diabetes mellitus. *Diabetes* 14: 619-633.
- Giepmans BN, Adams SR, Ellisman MH, Tsien RY (2006). The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 312: 217-224.
- Gluckman E, Ruggeri A, Volt F, Cunha R, Boudjedir K, Rocha V (2011). Milestones in umbilical cord blood transplantation. *Br J Haematol* 154: 441-447.
- Godfrey KJ, Mathew B, Bulman JC, Shah O, Clement S, Gallicano GI (2012). Stem cellbased treatments for Type-1 diabetes mellitus: bone marrow, embryonic, hepatic, pancreatic and induced pluripotent stem cells. *Diabetic Medicine* 29: 14-23.
- Gonez LJ, Knight KR (2010). Cell therapy for diabetes: stem cells, progenitors or beta-cell replication? *Mol Cell Endocrinol* 323: 55-61.
- Gou S, Wang C, Liu T, Wu H, Xiong J, Zhou F, et al. (2010). Spontaneous differentiation of murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells into adipocytes without malignant transformation after long-term culture. *Cells Tissues Organs* 191: 185-192.
- Grimm J, Kircher MF, Weissleder R (2007). Cell tracking. Principles and applications. *Radiologe* 47: 25-33.
- Groop L, Pociot F (2013). Genetics of diabetes - are we missing the genes or the disease? *Molecular and Cellular Endocrinology*.
- Gruppen, C: *Grundkurs Strahlenschutz. Praxiswissen für den Umgang mit radioaktiven Stoffen* (2008). 4. Aufl, Springer, Berlin Heidelberg.
- Guillen J (2012). FELASA guidelines and recommendations. *J Am Assoc Lab Anim Sci* 51: 311-321.
- Hamad AR, Arcara K, Uddin S, Donner T (2012). The potential of Fas ligand (apoptosisinducing molecule) as an unconventional therapeutic target in type 1 diabetes. *Front Immunol* 3: -196.
- Hartmann I, Hollweck T, Haffner S, Krebs M, Meiser B, Reichart B, et al. (2010). Umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells grow best under GMP-compliant culture conditions and maintain their phenotypic and functional properties. *J Immunol Methods* 363: 80-89.
- Hemmrich K, Meersch M, von HD, Pallua N (2006). Applicability of the dyes CFSE, CM-DiI and PKH26 for tracking of human preadipocytes to evaluate adipose tissue engineering. *Cells Tissues Organs* 184: 117-127.
- Henschler R, Deak E, Seifried E (2008). Homing of Mesenchymal Stem Cells. *Transfus Med Hemother* 35: 306-312.
- Hess D, Li L, Martin M, Sakano S, Hill D, Strutt B, et al. (2003). Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol* 21: 763-770.

Hiddemann, W.; Reiter-Theil, S.: Medizintechnik.(2000). In: Brockhaus: Mensch, Maschinen, Mechanismen. Brockhaus, Mannheim, Seite: 489-579

Hilderbrand SA, Weissleder R (2010). Near-infrared fluorescence: application to in vivo molecular imaging. *Curr Opin Chem Biol* 14: 71-79.

Hipp J, Atala A (2008). Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Rev* 4: 3-11.

Hiratsuka M, Uno N, Ueda K, Kurosaki H, Imaoka N, Kazuki K, et al. (2011). Integration-free iPS cells engineered using human artificial chromosome vectors. *PLoS One* 6: -e25961.

Holdsworth DW, Thornton MM, Drost D, Watson PH, Fraher LJ, Hodsman AB (2000). Rapid small-animal dual-energy X-ray absorptiometry using digital radiography. *J Bone Miner Res* 15: 2451-2457.

Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE (2006). Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells* 24: 1030-1041.

Hong HS, Kim YH, Son Y (2012). Perspectives on mesenchymal stem cells: Tissue repair, immune modulation, and tumor homing. *Arch Pharm Res* 35: 201-211.

Horwitz EM, Le BK, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, et al. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7: 393-395.

Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, et al. (2004). Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 306: 1568-1571.

Huss R, Xiangwei X, Heimberg H (2005). Adult stem cells regenerate the endocrine pancreas and normalize hyperglycaemia and insulin production in diabetic mice. *Verh Dtsch Ges Pathol* 89: 184-190.

Inzucchi SE (2002). Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes: scientific review. *JAMA* 287: 360-372.

Itakura S, Asari S, Rawson J, Ito T, Todorov I, Liu CP, et al. (2007). Mesenchymal stem cells facilitate the induction of mixed hematopoietic chimerism and islet allograft tolerance without GVHD in the rat. *Am J Transplant* 7: 336-346.

Ito T, Itakura S, Todorov I, Rawson J, Asari S, Shintaku J, et al. (2010). Mesenchymal stem cell and islet co-transplantation promotes graft revascularization and function. *Transplantation* 89: 1438-1445.

Jang KS, Lee KS, Yang SH, Jeun SS (2010). In vivo Tracking of Transplanted Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Murine Model of Stroke by Bioluminescence Imaging. *J Korean Neurosurg Soc* 48: 391-398.

Jasmin, Jelicks LA, Koba W, Tanowitz HB, Mendez-Otero R, Campos de Carvalho AC, et al. (2012). Mesenchymal bone marrow cell therapy in a mouse model of chagas disease. Where do the cells go? *PLoS Negl Trop Dis* 6: -e1971.

- Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW (2004). Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol* 32: 414-425.
- Jurewicz M, Yang S, Augello A, Godwin JG, Moore RF, Azzi J, et al. (2010). Congenic mesenchymal stem cell therapy reverses hyperglycemia in experimental type 1 diabetes. *Diabetes* 59: 3139-3147.
- Karnieli O, Izhar-Prato Y, Bulvik S, Efrat S (2007). Generation of insulin-producing cells from human bone marrow mesenchymal stem cells by genetic manipulation. *Stem Cells* 25: 2837-2844.
- Karounos DG, Goes SE (2003). Utilization of NOD mice in the study of type 1 diabetes. *Methods Mol Med* 83: 81-90.
- Kidd S, Spaeth E, Dembinski JL, Dietrich M, Watson K, Klopp A, et al. (2009). Direct evidence of mesenchymal stem cell tropism for tumor and wounding microenvironments using in vivo bioluminescent imaging. *Stem Cells* 27: 2614-2623.
- Kiess W, Kapellen T, Galler A, Schmidt A, Raile K (2001). Ätiopathogenese des Diabetes mellitus Typ 1. *Monatsschr Kinderheilkd* 149: 641-649.
- Kita K, Gauglitz GG, Phan TT, Herndon DN, Jeschke MG (2010). Isolation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells From the Sub-Amniotic Human Umbilical Cord Lining Membrane. *Stem Cells Dev* 19: 491-501.
- Koenig S, Krause P, Hosseini AS, Dullin C, Rave-Fraenk M, Kimmina S, et al. (2009). Noninvasive imaging of liver repopulation following hepatocyte transplantation. *Cell Transplant* 18: 69-78.
- Kuroda M, Ishida T, Horiuchi H, Kida N, Uozaki H, Takeuchi H, Tsuji K, Imamura T, Mori S, Machinami R, et al. (1995). Chimeric TLS/FUS-CHOP gene expression and the heterogeneity of its junction in human myxoid and round cell liposarcoma. *Am J Pathol*.147(5):1221-7.
- Lalande C, Miraux S, Derkaoui SM, Mornet S, Bareille R, Fricain JC, et al. (2011). Magnetic resonance imaging tracking of human adipose derived stromal cells within three-dimensional scaffolds for bone tissue engineering. *Eur Cell Mater* 21: 341-354.
- Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, Fergusson D, Winston BW, Marshall JC, et al. (2012). Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS ONE* 7: -e47559.
- Le Blanc K, Ringden O (2005). Immunobiology of human mesenchymal stem cells and future use in hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 11: 321-334.
- Lee GM, Thornthwaite JT, Rasch EM (1984). Picogram per cell determination of DNA by flow cytofluorometry. *Anal Biochem*.137(1):221-6.
- Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, et al. (2009). Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell* 5: 54-63.

Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, et al. (2006). Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 17438-17443.

Leiter EH, Serreze DV, Prochazka M (1990). The genetics and epidemiology of diabetes in NOD mice. *Immunol Today* 11: 147-149.

Levi B, James AW, Nelson ER, Vistnes D, Wu B, Lee M, et al. (2010). Human adipose derived stromal cells heal critical size mouse calvarial defects. *PLoS One* 5: -e11177.

Levy G (1994). Pharmacologic target-mediated drug disposition. *Clin Pharmacol Ther* 56: 248-252.

Li H, Fan X, Kovi RC, Jo Y, Moquin B, Konz R, et al. (2007). Spontaneous expression of embryonic factors and p53 point mutations in aged mesenchymal stem cells: a model of age-related tumorigenesis in mice. *Cancer Res* 67: 10889-10898.

Li J, Ezzelarab MB, Cooper DK (2012). Do mesenchymal stem cells function across species barriers? Relevance for xenotransplantation. *Xenotransplantation* 19: 273-285.

Li SC, Tachiki LML, Luo J, Dethlefs BA, Chen Z, Loudon WG (2010). A Biological Global Positioning System: Considerations for Tracking Stem Cell Behaviors in the Whole Body. *Stem Cell Rev and Rep* 6: 317-333.

Lin H, Xu R, Zhang Z, Chen L, Shi M, Wang FS (2011). Implications of the immunoregulatory functions of mesenchymal stem cells in the treatment of human liver diseases. *Cell Mol Immunol* 8: 19-22.

Lindner U, Kramer J, Rohwedel J, Schlenke P (2010). Mesenchymal Stem or Stromal Cells: Toward a Better Understanding of Their Biology? *Transfus Med Hemother* 37: 75-83.

Liu E, Yu L, Moriyama H, Eisenbarth GS (2004). Animal models of insulin-dependent diabetes. *Methods Mol Med* 102: 195-212.

Liu M, Han ZC (2008). Stem Cells Review Series: Mesenchymal stem cells: biology and clinical potential in type 1 diabetes therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 12: 1155-1168.

Lo Celso C, Wu JW, Lin CP (2009). In vivo imaging of hematopoietic stem cells and their microenvironment. *J Biophotonics* 2: 619-631.

Lopez-Iglesias P, Blazquez-Martinez A, Fernandez-Delgado J, Regadera J, Nistal M, Miguel MP (2011). Short and long term fate of human AMSC subcutaneously injected in mice. *World J Stem Cells* 3: 53-62.

Love Z, Wang F, Dennis J, Awadallah A, Salem N, Lin Y, et al. (2007). Imaging of mesenchymal stem cell transplant by bioluminescence and PET. *J Nucl Med* 48: 2011-2020.

Luo J, Quan J, Tsai J, Hobensack CK, Sullivan C, Hector R, et al. (1998). Nongenetic mouse models of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism: Clinical and Experimental* 47: 663-668.

Luo Y, Liu C, Qu Y, Fang N (2012). Towards single-cell analysis for pharmacokinetics. *Bioanalysis* 4: 453-463.

Mabed M, Shahin M (2012). Mesenchymal stem cell-based therapy for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Current Stem Cell Research and Therapy* 7: 179-190.

Macisaac ZM, Shang H, Agrawal H, Yang N, Parker A, Katz AJ (2012). Long-term in-vivo tumorigenic assessment of human culture-expanded adipose stromal/stem cells. *Exp Cell Res* 318: 416-423.

Madec AM, Mallone R, Afonso G, Abou ME, Mesnier A, Eljaafari A, et al. (2009). Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia* 52: 1391-1399.

Madsen OD (2005). Stem cells and diabetes treatment. *APMIS* 113: 858-875.

Madsen OD, Kaestner KH (2004). Antibodies to islet beta cell surface markers. *Current Medicinal Chemistry: Immunology, Endocrine and Metabolic Agents* 4: 309-313.

Maehle AH (2011). Ambiguous cells: the emergence of the stem cell concept in the nineteenth and twentieth centuries. *Notes and Records of the Royal Society* 65: 359-378.

Mager DE (2006). Target-mediated drug disposition and dynamics. *Biochem Pharmacol* 72: 1-10.

Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino Y (1980). Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *Jikken Dobutsu* 29: 1-13.

Marongiu F, Gramignoli R, Sun Q, Tahan V, Miki T, Dorko K, et al. (2010). Isolation of amniotic mesenchymal stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 12: 1E.5.1-1E.5.11.

Matushansky I, Hernando E, Socci ND, Mills JE, Matos TA, Edgar MA, et al. (2007). Derivation of sarcomas from mesenchymal stem cells via inactivation of the Wnt pathway. *J Clin Invest* 117: 3248-3257.

McAuliffe JC, Christein JD (2013). Type 2 Diabetes Mellitus and Pancreatic Cancer. *Surgical Clinics of North America* 93: 619-627.

Meyerrose TE, De Ugarte DA, Hofling AA, Herrbrich PE, Cordonnier TD, Shultz LD, et al. (2007). In vivo distribution of human adipose-derived mesenchymal stem cells in novel xenotransplantation models. *Stem Cells* 25: 220-227.

Miura M, Miura Y, Padilla-Nash HM, Molinolo AA, Fu B, Patel V, et al. (2006). Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 24: 1095-1103.

Moore A, Bonner-Weir S, Weissleder R (2001). Noninvasive in vivo measurement of beta-cell mass in mouse model of diabetes. *Diabetes*. 50(10):2231-6.

Mouiseddine M, Francois S, Souidi M, Chapel A (2012). Intravenous human mesenchymal stem cells transplantation in NOD/SCID mice preserve liver integrity of irradiation damage. *Methods Mol Biol* 826: 179-188.

Nagano K, Yoshida Y, Isobe T (2008). Cell surface biomarkers of embryonic stem cells. *Proteomics* 8: 4025-4035.

Nakamura T, Terajima T, Ogata T, Ueno K, Hashimoto N, Ono K, et al. (2006). Establishment and pathophysiological characterization of type 2 diabetic mouse model produced by streptozotocin and nicotinamide. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 29: 1167-1174.

Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, et al. (2009). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 15: 42-49.

Neubauer M, Wegmeyer H, Huss R (2012): The Biology and Regenerative Potential of Stem Cells and Their Mesenchymal Progeny. In: Hayat MA (ed). *Stem Cells and Cancer Stem Cells*, Volume 6. Springer Netherlands. pp 143-160.

Newman RE, Yoo D, LeRoux MA, nilkovitch-Miagkova A (2009). Treatment of inflammatory diseases with mesenchymal stem cells. *Inflamm Allergy Drug Targets* 8: 110-123.

Nystedt J, Anderson H, Tikkanen J, Pietila M, Hirvonen T, Takalo R, et al. (2013). Cell surface structures influence lung clearance rate of systemically infused mesenchymal stromal cells. *Stem Cells* 31: 317-326.

Okano H, Nakamura M, Yoshida K, Okada Y, Tsuji O, Nori S, et al. (2013). Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 112: 523-533.

Okita K, Hong H, Takahashi K, Yamanaka S (2010). Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nat Protoc* 5: 418-428.

Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, et al. (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 8: 409-412.

Okita K, Yamanaka S (2011). Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366: 2198-2207.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P (2003). Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. *Pediatr Transplant* 7 Suppl 3: 86-88.

Ortiz LA, Dutreil M, Fattman C, Pandey AC, Torres G, Go K, et al. (2007). Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 11002-11007.

Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, et al. (2003). Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8407-8411.

Pantel K, Brakenhoff RH, Brandt B (2008). Detection, clinical relevance and specific biological properties of disseminating tumour cells. *Nat Rev Cancer* 8: 329-340.

Parekkadan B, Milwid JM (2010). Mesenchymal stem cells as therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng* 12: 87-117.

- Parish CR (1999). Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol* 77: 499-508.
- Park HY, Noh EH, Chung HM, Kang MJ, Kim EY, Park SP (2012). Efficient generation of virus-free iPS cells using liposomal magnetofection. *PLoS One* 7: -e45812.
- Pileggi A (2012). Mesenchymal stem cells for the treatment of diabetes. *Diabetes* 61: 1355-1356.
- Pistoia V, Raffaghello L (2010). Potential of mesenchymal stem cells for the therapy of autoimmune diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 6: 211-218.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143-147.
- Poll D, Parekkadan B, Borel RI, Tilles A, Yarmush M (2008). Mesenchymal Stem Cell Therapy for Protection and Repair of Injured Vital Organs. *Cellular and Molecular Bioengineering* 1: 42-50.
- Prockop DJ, Brenner M, Fibbe WE, Horwitz E, Le BK, Phinney DG, et al. (2010). Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy. *Cytotherapy* 12: 576-578.
- Prohazka F, Dallman MJ, Lo Celso C (2013). From seeing to believing: labelling strategies for in vivo cell-tracking experiments. *Interface Focus* 3.
- Quah BJ, Warren HS, Parish CR (2007). Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. *Nat Protoc* 2: 2049-2056.
- Rackham CL, Chagastelles PC, Nardi NB, Hauge-Evans AC, Jones PM, King AJ (2011). Cotransplantation of mesenchymal stem cells maintains islet organisation and morphology in mice. *Diabetologia* 54: 1127-1135.
- Ramot Y, Meiron M, Toren A, Steiner M, Nyska A (2009). Safety and biodistribution profile of placental-derived mesenchymal stromal cells (PLX-PAD) following intramuscular delivery. *Toxicol Pathol.* (5):606-16.
- Ren G, Chen X, Dong F, Li W, Ren X, Zhang Y, et al. (2012). Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues. *Stem Cells Transl Med* 1: 51-58.
- Ren G, Roberts AI, Shi Y (2011). Adhesion molecules: key players in Mesenchymal stem cell mediated immunosuppression. *Cell Adh Migr* 5: 20-22.
- Ren YX, Finckenstein FG, Abdueva DA, Shahbazian V, Chung B, Weinberg KI, et al. (2008). Mouse mesenchymal stem cells expressing PAX-FKHR form alveolar rhabdomyosarcomas by cooperating with secondary mutations. *Cancer Res* 68: 6587-6597.
- Riggi N, Cironi L, Provero P, Suva ML, Kaloulis K, Garcia-Echeverria C, et al. (2005). Development of Ewing's sarcoma from primary bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res* 65: 11459-11468.

Riggi N, Cironi L, Provero P, Suva ML, Stehle JC, Baumer K, et al. (2006). Expression of the FUS-CHOP fusion protein in primary mesenchymal progenitor cells gives rise to a model of myxoid liposarcoma. *Cancer Res* 66: 7016-7023.

Riggi N, Suva ML, Suva D, Cironi L, Provero P, Tercier S, et al. (2008). EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells. *Cancer Res* 68: 2176-2185.

Rodriguez R, Garcia-Castro J, Trigueros C, Garcia Arranz M, Menendez P (2012a): Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Applications and Cancer Modeling. In: Lopez-Larrea C, Lopez-Vázquez A, Suárez-Alvarez B (eds). *Stem Cell Transplantation*. Springer US. pp 187-205.

Rodriguez R, Rubio R, Gutierrez-Aranda I, Melen GJ, Elosua C, Garcia-Castro J, et al. (2011). FUS-CHOP fusion protein expression coupled to p53 deficiency induces liposarcoma in mouse but not in human adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Stem Cells* 29: 179-192.

Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN (2003). Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 21: 105-110.

Rosland GV, Svendsen A, Torsvik A, Sobala E, McCormack E, Immervoll H, et al. (2009). Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Res* 69: 5331-5339.

Rubio R, Garcia-Castro J, Gutierrez-Aranda I, Paramio J, Santos M, Catalina P, et al. (2010). Deficiency in p53 but not retinoblastoma induces the transformation of mesenchymal stem cells in vitro and initiates leiomyosarcoma in vivo. *Cancer Res* 70: 4185-4194.

Ruster B, Gottig S, Ludwig RJ, Bistrrian R, Muller S, Seifried E, et al. (2006). Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood* 108: 3938-3944.

Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP (2005). Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)* 2: -8.

Schmitz S (2009): *Der Experimentator: Zellkultur*. Spektrum, Akad. Verl.: Heidelberg.

Schrepfer S, Deuse T, Reichenspurner H, Fischbein MP, Robbins RC, Pelletier MP (2007). Stem cell transplantation: the lung barrier. *Transplant Proc* 39: 573-576.

Schroeder IS (2012). Potential of pluripotent stem cells for diabetes therapy. *Curr Diab Rep* 12: 490-498.

Serafini M, Verfaillie CM (2006). Pluripotency in adult stem cells: state of the art. *Semin Reprod Med* 24: 379-388.

Seshareddy K, Troyer D, Weiss ML (2008): Method to Isolate Mesenchymal-Like Cells from Wharton's Jelly of Umbilical Cord. In. pp 101-119.

Seufert J (2011). Stammzelltherapie. *Diabetologie* 7: 595-599.

Sharpe ME, Morton D, Rossi A (2012). Nonclinical safety strategies for stem cell therapies. *Toxicol Appl Pharmacol* 262: 223-231.

Shi Y, Hu G, Su J, Li W, Chen Q, Shou P, et al. (2010). Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res* 20: 510-518.

Si Y, Zhao Y, Hao H, Liu J, Guo Y, Mu Y, et al. (2012). Infusion of mesenchymal stem cells ameliorates hyperglycemia in type 2 diabetic rats: identification of a novel role in improving insulin sensitivity. *Diabetes* 61: 1616-1625.

Solari MG, Srinivasan S, Boumaza I, Unadkat J, Harb G, Garcia-Ocana A, et al. (2009). Marginal mass islet transplantation with autologous mesenchymal stem cells promotes longterm islet allograft survival and sustained normoglycemia. *J Autoimmun* 32: 116-124.

Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T (2001). Stem cells find their niche. *Nature* 414: 98-104.

Steele C, Hagopian WA, Gitelman S, Masharani U, Cavaghan M, Rother KI, et al. (2004). Insulin secretion in type 1 diabetes. *Diabetes* 53: 426-433.

Stroppe, H.: Physik (2005). 13. Aufl. Fachbuchverlag Leipzig.

Sutton EJ, Henning TD, Pichler BJ, Bremer C, drup-Link HE (2008). Cell tracking with optical imaging. *Eur Radiol* 18: 2021-2032.

Takahashi K, Narita M, Yokura M, Ichisaka T, Yamanaka S (2009). Human induced pluripotent stem cells on autologous feeders. *PLoS One* 4: -e8067.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872.

Takahashi K, Yamanaka S (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.

Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, et al. (2010). Clinicalgrade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood* 115: 1549-1553.

Tattersall RB (1974). Mild familial diabetes with dominant inheritance. *Q J Med* 43: 339-357.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147.

Thorn LM, Forsblom C, Fagerudd J, Thomas MC, Pettersson-Fernholm K, Saraheimo M, et al. (2005). Metabolic syndrome in type 1 diabetes: association with diabetic nephropathy and glycemic control (the FinnDiane study). *Diabetes Care* 28: 2019-2024.

Tipler, P.A.: Physik (1994). Spektrum Heidelberg .

Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, Panoskaltsis MA, McElmurry RT, Bell S, et al. (2007). Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 25: 371-379.

Toma C, Wagner WR, Bowry S, Schwartz A, Villanueva F (2009). Fate of culture-expanded mesenchymal stem cells in the microvasculature: in vivo observations of cell kinetics. *Circ Res* 104: 398-402.

Tsai PJ, Wang HS, Shyr YM, Weng ZC, Tai LC, Shyu JF, et al. (2012). Transplantation of insulin-producing cells from umbilical cord mesenchymal stem cells for the treatment of streptozotocin-induced diabetic rats. *J Biomed Sci* 19: -47.

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V (2006). Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol* 36: 2566-2573.

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 8: 726-736.

Urban VS, Kiss J, Kovacs J, Gocza E, Vas V, Monostori E, et al. (2008). Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells* 26: 244-253.

Vácha J (1975). Blood volume in inbred strain BALB/c, CBA/J and C57BL/10 mice determined by means of ⁵⁹Fe-labelled red cells and ⁵⁹Fe bound to transferrin. *Physiol Bohemoslov.* (5):413-9.

Vilalta M, Degano IR, Bago J, Gould D, Santos M, Garcia-Arranz M, et al. (2008). Biodistribution, long-term survival, and safety of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells transplanted in nude mice by high sensitivity non-invasive bioluminescence imaging. *Stem Cells Dev* 17: 993-1003.

Wang Y, Huso DL, Harrington J, Kellner J, Jeong DK, Turney J, et al. (2005). Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture. *Cytotherapy* 7: 509-519.

Wen Y, Chen B, Ildstad ST (2011). Stem cell-based strategies for the treatment of type 1 diabetes mellitus. *Expert Opin Biol Ther* 11: 41-53.

Wetzke,M.; Happle,C.: Bildgebende Verfahren (2009). Urban & Fischer, München.

Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H (2004). Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 27: 1047-1053.

Williams AR, Hare JM (2011). Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res* 109: 923-940.

Witkowska-Zimny M, Wrobel E (2011). Perinatal sources of mesenchymal stem cells: Wharton's jelly, amnion and chorion. *Cell Mol Biol Lett* 16: 493-514.

Wolbank S, Peterbauer A, Wassermann E, Hennerbichler S, Voglauer R, van GM, et al. (2007). Labelling of human adipose-derived stem cells for non-invasive in vivo cell tracking. *Cell Tissue Bank* 8: 163-177.

Wong RS (2011). Mesenchymal stem cells: angels or demons? *J Biomed Biotechnol* 2011: -459-510.

Wu XH, Liu CP, Xu KF, Mao XD, Zhu J, Jiang JJ, et al. (2007). Reversal of hyperglycemia in diabetic rats by portal vein transplantation of islet-like cells generated from bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 13: 3342-3349.

Xu J, Lu Y, Ding F, Zhan X, Zhu M, Wang Z (2007). Reversal of diabetes in mice by intrahepatic injection of bone-derived GFP-murine mesenchymal stem cells infected with the recombinant retrovirus-carrying human insulin gene. *World J Surg* 31: 1872-1882.

Xu W, Qian H, Zhu W, Chen Y, Shao Q, Sun X, et al. (2004). A novel tumor cell line cloned from mutated human embryonic bone marrow mesenchymal stem cells. *Oncol Rep* 12: 501-508.

Yan L, Han Y, He Y, Xie H, Liu J, Zhao L, et al. (2007). Cell tracing techniques in stem cell transplantation. *Stem Cell Rev* 3: 265-269.

Yeung TY, Seeberger KL, Kin T, Adesida A, Jomha N, Shapiro AM, et al. (2012). Human mesenchymal stem cells protect human islets from pro-inflammatory cytokines. *PLoS ONE* 7:e38189.

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920.

Yu X, Lu C, Liu H, Rao S, Cai J, Liu S, et al. (2013). Hypoxic Preconditioning with Cobalt of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Improves Cell Migration and Enhances Therapy for Treatment of Ischemic Acute Kidney Injury. *PLoS ONE* 8: e62703.

Zanone MM, Favaro E, Miceli I, Grassi G, Camussi E, Caorsi C, et al. (2010). Human mesenchymal stem cells modulate cellular immune response to islet antigen glutamic acid decarboxylase in type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 95: 3788-3797.

Ziegler AG, Rewers M, Simell O, Simell T, Lempainen J, Steck A, et al. (2013). Seroconversion to multiple islet autoantibodies and risk of progression to diabetes in children. *JAMA* 309: 2473-2479.

Eidesstattliche Versicherung

Kuhlen, Jennifer

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Pharmakokinetik Humaner Mesenchymaler Stammzellen in Mäusen“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand